N° D'ORDRE : 858

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT
Spécialité Biophysique

PAR

Justin TEISSIE

ETUDE PAR FLUORESCENCE DE LA STRUCTURE, DE LA DYNAMIQUE ET DES INTERACTIONS DE MODELES PHOSPHOLIPIDIQUES DE MEMBRANES

Soutenue le 6 Mars 1979 devant la Commission d'Examen

MM. J.	ASSELINEAU, Professeur Université de Toulouse III	Président
A.	BAUDRAS, Professeur Université de Toulouse III	Rapporteurs
C.	HELENE, Professeur Museum National d'Histoire Naturelle	
T.Y.	TSONG, Professeur Johns Hopkins University (Baltimore - USA)	
P.	LAUGER, Professeur Université de Constance (RFA)	
M.	LAZDUNSKI, Professeur Université de Nice	
J.F.	TOCANNE, Chargé de recherches C.N.R.S.	

N° D'ORDRE :

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT
Spécialité Biophysique

PAR

Justin TEISSIE

ETUDE PAR FLUORESCENCE DE LA STRUCTURE, DE LA DYNAMIQUE ET DES INTERACTIONS DE MODELES PHOSPHOLIPIDIQUES DE MEMBRANES

Soutenue le 6 Mars 1979 devant la Commission d'Examen

MM. J.	ASSELINEAU, Professeur Université de Toulouse III	Président
A.	BAUDRAS, Professeur Université de Toulouse III	Rapporteurs
C.	HELENE, Professeur Museum National d'Histoire Naturelle	
T.Y.	TSONG, Professeur Johns Hopkins University (Baltimore - USA)	
P.	LAUGER, Professeur Université de Constance (RFA)	
M.	LAZDUNSKI, Professeur Université de Nice	
J.F.	TOCANNE, Chargé de recherches C.N.R.S.	

UNIV.
LEIDEN
BIB.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

PRESIDENCE

M. MARTIN ..... Président
M. LARENG ..... 1er Vice-Président
Mlle GOUYON ..... 2ème Vice-Président

CORPS PROFESSORAL

ORDRE DES SCIENCES

HONORARIAT

M. BEDOS ..... Professeur honoraire
M. BLAIZOT ..... Doyen honoraire
M. CAPDECOMME .. Doyen honoraire, Recteur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. COUCHET ..... Professeur honoraire
M. DUPOUY ..... Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile .. Doyen honoraire, Professeur honoraire
M. GAUSSEN ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. MARGULIS ..... Professeur honoraire
M. MASDUPUY ..... Professeur honoraire
M. MATHIS ..... Doyen honoraire
M. MIGNONAC ..... Professeur honoraire
M. MIQUEL ..... Professeur honoraire
M. MORQUER ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT ..... Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER . Professeur honoraire
M. VANDEL ..... Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. DUPIN ..... Professeur honoraire
M. TRICHE ..... Professeur honoraire
M. PERRIER ..... Professeur honoraire

PROFESSEURS

M. CAPDECOMME .. Minéralogie, Correspondant de l'Institut
M. GALLAIS ..... Chimie, Membre de l'Institut
M. FERT ..... Physique
M. LESBRE ..... Chimie Organique
M. HURON ..... Mathématiques Appliquées
M. LEDOUX ..... Zoologie Appliquée
M. RIVALS ..... Agriculture
M. MATHIS ..... Chimie
M. ORLIAC ..... Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE .. Physique
M. ANGELIER ..... Zoologie
Mlle de FERRE ..... Botanique
M. FARRAN ..... Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET ..... Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY ..... Physiologie et Ecophysiolo-
M. LAGASSE ..... Electrotechnique
M. BLANC ..... Physique Nucléaire
M. LEREDDE ..... Botanique
M. LELUBRE ..... Géologie

M. LALAGUE ..... Mathématiques Générales
M. BOUIGUE ..... Astronomie
M. ASSELINEAU .... Chimie Biologique
M. MAURET ..... Chimie Systématique
M. AGID ..... Physiologie
M. MONTANT ..... Cryptogamie
M. GAUTIER ..... Physique
M. CRUMEYROLLE . Mathématiques
M. GOURINARD .... Géologie
M. PULOU ..... Minéralogie
M. CAMBOU ..... Physique Spatiale
M. LACOSTE ..... Electrotechnique
M. THIBAULT ..... Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART ..... Mathématiques
M. MEDIONI ..... Psychophysiologie
M. RAYNAUD P. ..... Physiologie Animale
M. ZALTA ..... Chimie Biologique
M. SEVELY ..... Electrotechnique
M. POMMIEZ ..... Mathématiques
M. REY Paul ..... Biologie Végétale
M. COULOMB ..... Physique
M. TRINQUIER ..... Physique
M. MARONI ..... Chimie
M. BEETSCHEN .... Biologie Générale
M. DERACHE ..... Physiologie Animale
M. SATGE ..... Chimie Organique
M. LATTES ..... Chimie
M. VEDRENNE ..... Géophysique
M. DURAND-DELGA Géologie
M. CARRARA ..... Physique
M. MAHENC ..... Chimie
M. MIROUSE ..... Géologie
M. BITSCH ..... Zoologie
M. DEGEILH ..... Physique
M. MARTIN J.C. .... Génie Electrique
M. REY Gérard ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SICARD ..... Biologie Génétique
M. SOUQUET ..... Géologie
M. TOUZE ..... Physiologie Végétale
M. FRASNAY ..... Mathématiques (Algèbre et Combinatoire)
M. CASSAGNAU .... Zoologie
M. CAUSSINUS ..... Mathématiques Appliquées (Statistiques Appliquées)
M. PESCIA ..... Physique
M. PICCA ..... Physique de l'Atmosphère
M. BAUDIERE ..... Botanique Fondamentale et Pyrénéenne
M. BARRANS ..... Chimie Physique Organique
M. POILBLANC ..... Chimie Minérale
M. PERENNOU ..... Informatique
M. ATTEIA ..... Mathématiques
M. CASTAN ..... Informatique
M. COLLETTE ..... Physique
M. REME ..... Mesures Physiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. MERIC ..... Mathématiques Appliquées
Mme LECAL ..... Zoologie
M. PILOD ..... Physique
M. LARROQUE ..... Physique
Mlle LAPEYRE ..... Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND ..... Chimie
M. DESQ ..... Mathématiques
M. ROCARD ..... Electronique
M. GUERIN ..... Mathématiques
M. SCHNEIDER ..... Biologie Cellulaire
M. de LOTH ..... Chimie Physique
M. SAPORTE ..... Physique
M. THENOZ ..... Génie Civil
M. DURAND Ph. .... Physique
M. FONTAN ..... Physique Nucléaire
M. BAUDRAS ..... Chimie Biologique
M. CALVET ..... Mécanique des Fluides
M. PAGANI ..... Physique
M. BEAUFILS ..... Informatique
M. BERTHELEMY ... Zoologie
M. TERJANIAN ..... Mathématiques
M. MORUCCI ..... Génie Biologique et Médical
M. BONEL ..... Chimie
M. SOTIROPOULOS . Chimie Organique
M. CUPPENS ..... Mathématiques
M. VERDIER ..... Physique
M. ETTINGER ..... Mathématiques
M. BONNET Louis ... Biologie
M. JOSSERAND .... Mesures Physiques
M. ROUTIE ..... Génie Chimique
M. COTTU ..... Génie Mécanique
M. HURAUX ..... Physique
Mme GERVAIS ..... Chimie Inorganique
M. BANCEL ..... Mathématiques
M. LOUARN ..... Génétique
M. BOUDET ..... Physiologie Végétale

PROFESSEUR ASSOCIE

M. GUMOWSKI ..... Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle BARBANCE .... Mathématiques
M. GILLY ..... Génie Mécanique
M. MARAL ..... Physique
M. LEGRAND ..... Génie Civil
M. ABATUT ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MAUSS ..... Mécanique
M. BETOURNE ..... Informatique
M. CAMPAN ..... Psychophysiologie
M. CLERC ..... Mécanique
M. GRIFONE ..... Mathématiques
M. LETAC ..... Mathématiques
M. COUOT ..... Mathématiques, Analyse Numérique
M. NGUYEN THANH VAN Mathématiques
M. TRAVERSE ..... Problèmes Chimiques de l'Energie
M. ALRAN ..... Génie Chimique
M. REY J. ..... Géologie Sédimentaire et Paléontologie
M. DARTIGUENAVE Chimie Minérale Moléculaire
M. HERAULT ..... Chimie
M. PRADINES ..... Mathématiques
M. GALINIER ..... Informatique
M. VIGNOLLE ..... Informatique
M. DEPARIS ..... Embryologie
M. CAVALIE ..... Physiologie Végétale
M. MASSOL ..... Chimie des Composés Organiques et Organominéraux d'intérêt biologique

M. HARTMANN .... Mécanique
M. ROUSSET ..... Chimie Appliquée (Matériaux)
M. TARDY ..... Sciences de la Terre et Aménagement

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. HURLEY ..... Physique Spatiale
M. SINGH ..... Automatique

ADMINISTRATION

M. PRINEAU ..... Secrétaire Général de l'Université

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

M. SARAZIN ..... Directeur Général

PROFESSEURS

M. ROQUES ..... Chimie Appliquée, Génie Chimique
M. GRATELOUP .... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MASO ..... Génie Civil
M. MIRA ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. DURAND Gilbert . Biologie et Biochimie Appliquée
M. ASKENAZY ..... Physique Atomique, Physique du Solide
M. LETURCQ ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SCHUTTLER .... Electronique, Electrotechnique, Automatique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. FAGET ..... Physique Atomique, Physique du Solide
M. BARTHET ..... Mécanique
M. TITLI ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique

MAITRES DE CONFERENCES

M. SIRIEYS ..... Mécanique
M. BESOMBES-VAILHE ..... Chimie Appliquée, Génie Chimique
M. BROUSSEAU .... Physique Atomique, Physique du Solide
M. VERDIER ..... Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. BOUDET René ... Mécanique
M. GROH ..... Physique Atomique, Physique du Solide
M. JAVELAS ..... Génie Civil
M. LACAZE ..... Mathématiques II
M. LORRAIN ..... Génie Civil

ADMINISTRATION

M. CROS ..... Secrétaire Général

Liste établie au 1er Octobre 1977
pour l'année universitaire 1977-1978

Ce travail a été effectué sous la direction de Mr. Le Professeur A. BAUDRAS, au Centre de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour la confiance dont il m'a honoré.

J'exprime toute ma reconnaissance à Messieurs J. ASSELINEAU, Professeur à l'Université de Toulouse, C. HELENE, Professeur au Museum d'Histoire Naturelle, directeur du Centre de Biophysique Moléculaire du C.N.R.S., P. LAUGER, Professeur à l'Université de Constance (RFA), M. LAZDUNSKI, Professeur à l'Université de Nice et T.Y. TSONG, Professeur à la Johns Hopkins University de Baltimore (USA) de me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je remercie plus particulièrement le Professeur LAUGER de m'avoir accueilli lors d'un stage dans son laboratoire.

J.F. TOCANNE, Chargé de recherches au C.N.R.S., m'a fait profiter de toute son expérience lors de discussions animées. Je lui exprime ici toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je remercie M. PRATS pour les discussions que nous avons eues ainsi que M. BARDET pour toute l'aide matérielle qu'il a apportée à mes recherches.

J'exprime ma profonde sympathie à tous mes collègues du Centre de recherches pour les conseils amicaux et l'aide qu'ils m'ont toujours donnés.

La dactylographie de ce manuscrit est due au zèle de M. PARES, qu'elle trouve ici ainsi que ses collègues, l'expression de mon amicale reconnaissance.

---=oOo=---

TABLE DES MATIERES

page

INTRODUCTION.....1

MEMBRANES MODELES.....7

I. COUCHE MONOMOLECULAIRE.....7
II. DISPERSIONS LIPIDIQUES.....10
III. MICROVESICULES.....10
IV. FILMS NOIRS OU BLM.....13
V. CONCLUSION.....13

APPLICATION DE LA FLUORESCENCE DANS L'ETUDE DES SYSTEMES MEMBRANAIRES.....14

I. THEORIE.....14
I.1. Définition.....14
I.2. Mécanisme.....14
I.2.1. Description
I.2.2. Localisation spectrale de l'émission
I.2.3. Durée de vie
I.2.4. Rendement quantique
I.3. Influence de l'environnement.....19
I.4. Propriétés de polarisation.....21
I.4.1. Application aux mesures de mobilité
I.4.2. Détermination de termes d'orientations
I.5. Transfert d'énergie.....22

II. ASPECTS PRATIQUES DE LA FLUORESCENCE.....24
II.1. Avantages.....24
II.1.1. Richesse de l'information
II.1.2. Sensibilité de la méthode

II.2. Inconvénients et limites.....25

ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA DYNAMIQUE DE MEMBRANES MODELES.....27

"PHASE TRANSITIONS IN PHOSPHOLIPID MONOLAYERS AT THE AIR-WATER INTERFACE : A FLUORESCENCE STUDY"
(publié à FEBS Lett.).....34

"ORIENTATION PROCESSES INDUCED BY PHASE TRANSITION OF PHOSPHOLIPID MONOLAYERS SPREAD AT THE AIR-WATER INTERFACE : A FLUORESCENCE STUDY WITH POLARIZED INCIDENT LIGHT"
(soumis à Chem. Phys. Lipids).....38

"FLUORESCENCE STUDIES OF 1-8 ANILINONAPHTALENE SULFONATE BINDING TO LECITHIN MONOLAYERS SPREAD AT THE AIR-WATER INTERFACE : EFFECTS OF THE COMPRESSION STATE OF THE FILM AND OF THE IONIC CONTENT OF THE SUBPHASE"
(sous presse à J. Colloïd Interf. Sci.).....55

"USE OF ANS AS A PROBE OF MOLECULAR PACKING IN DIPALMITOYL-PHOSPHATIDYLCHOLINE ASSEMBLIES"
(soumis à FEBS Lett.).....77

"FLUORESCENCE TEMPERATURE JUMP RELAXATIONS OF DANSYLPHOSPHATIDYLETHANOLAMINE IN AQUEOUS DISPERSIONS OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE DURING THE GEL TO LIQUID-CRYSTAL TRANSITION"
(soumis à Biochim. Biophys. Acta).....91

"A FLUORESCENCE APPROACH OF THE DETERMINATION OF TRANSLATIONAL DIFFUSION COEFFICIENTS OF LIPIDS IN PHOSPHOLIPID MONOLAYER AT THE AIR-WATER INTERFACE"
(publié à Eur. J. Biochem.).....109

CONCLUSION.....119

ETUDE DE L'INTERACTION DU CYTOCHROME c ET DE MEMBRANES MODELES.....123

"THE USE OF FLUORESCENT PROBES FOR STUDYING THE INTERACTION OF PROTEINS WITH BLACK LIPID MEMBRANES"
(publié à Z. Naturforsch).....125

"A FLUORESCENCE STUDY OF THE BINDING OF CYTOCHROME c TO MIXED-PHOSPHOLIPID MICROVESICLES : EVIDENCE FOR A PREFERRED ORIENTATION OF THE BOUND PROTEIN"
(publié à Biochimie).....131

"CONFIGURATION DU CYTOCHROME c FIXE A DES COUCHES MONO-MOLECULAIRES ET A DES MICROVESICULES".....143

CONCLUSION.....169

ANNEXES.....173

REALISATION DES COUCHES MOLECULAIRES.....174

REALISATION DES MICROVESICULES.....176

REALISATION DE FILMS NOIRS.....178

SPECTROPHOTOFLUORIMETRE DE RELAXATION THERMIQUE.....179

FLUORIMETRE DES INTERFACES.....184

CALCUL DE SIMULATION DE L"ORIENTATION DU PLAN DE L'HEME.....188

BIBLIOGRAPHIE.....190

INTRODUCTION

L'importance des structures membranaires pour le métabolisme de la cellule est reconnue depuis longtemps. L'étude des relations structure-fonction des structures membranaires s'est considérablement développée au cours des trente dernières années et constitue un domaine très actif de la recherche biologique contemporaine (1, 2, 3). L'intérêt s'est progressivement déplacé des études analytiques des constituants isolés au profit de celles qui concernent leur organisation au sein d'assemblages structurés tels qu'ils sont réellement présents au niveau cellulaire ainsi que les fonctions des systèmes organisés. De nombreuses activités essentielles n'existent que lorsque de telles structures sont présentes : les membranes ne sont plus considérées comme de simples barrières limitant l'espace cellulaire mais comme des éléments structuralement et fonctionnellement essentiels à certaines activités. Il suffit de rappeler les exemples de la phosphorylation ou de la photosynthèse dont la machinerie repose sur l'organisation des membranes chloroplastiques. Ces exemples sont classiques mais d'autres processus vitaux semblent au moins pour certains aspects, être dépendants d'interactions impliquant des structures membranaires. Ainsi, les mécanismes d'initiation de la synthèse protéïque sont maintenant soupçonnés d'être, au moins partiellement, localisés au niveau membranaire (4). Les phénomènes évoqués peuvent être qualifiés d'évènements intracellulaires et constituent un domaine de développement relativement récent par comparaison avec les études portant sur les phénomènes de transport ou sur l'activité électrique de cellules spécialisées (5).

L'analyse du rôle de la structure procède par étapes complémentaires. Il convient d'une part de connaître les différents éléments constitutifs de la membrane puis d'étudier les modes d'assemblage qui leur permettent de réaliser la structure membranaire. Ce type d'organisation doit être étudié non seulement sur le plan statique (inter-relations spatiales entre les diverses espèces, facteurs d'orientation...) mais aussi d'un point de vue dynamique. Ce dernier facteur apparaît aujourd'hui fondamental pour le définition de nombreuses activités (enzymes mitochondriales, phénomènes de fusion cellulaire, de vieillissement cellulaire) (6, 7, 8, 9).

Les membranes apparaissent comme des assemblages complexes de lipides, de sucres et de protéines. Les proportions relatives de chaque classe de constituants dépendent du type de membrane. Ainsi, la myéline est essentiellement composée de lipides alors que la proportion de protéines est largement majoritaire dans les mitochondries. La nature des éléments de chaque classe est également une caractéristique de l'organite étudiée mais également de l'état physiologique de la cellule (état de différentiation, de vieillissement). Ces études ont été effectuées avec précision essentiellement en ce qui concerne

sucres et lipides, les données relatives aux protéines sont beaucoup plus rares et souvent ambigües. En effet, lors de l'isolement des composants de la membrane, deux classes de protéines sont clairement distinguées. Les constituants qui sont isolés par des méthodes douces (essentiellement des effets de force ionique) sont appelés "extrinsèques", les autres dont l'extraction nécessite l'emploi de procédés ou d'agents à caractère déstructurant - à la limite dénaturant pour certaines espèces - (détergents, solvants organiques, protéolyse) sont qualifiés "d'intrinsèques" (10, 13). Les protéines intrinsèques jouent un rôle essentiel tant en termes de structures membranaires qu'en ce qui concerne les activités enzymatiques. Les difficultés rencontrées le plus souvent pour leur extraction et purification sans modifications irréversibles expliquent que peu d'entre elles soient bien connues. Quelques structures primaires ont été établies. La discussion de leur organisation spatiale (structure secondaire et d'ordre supérieur) ne prend une signification que lorsque la protéine est dans son environnement natif. Mais ici, un handicap sérieux est la grande difficulté de l'adaptation des méthodes d'analyse structurale à l'étude d'un constituant spécifique intégré dans un ensemble complexe lui-même structuré. S'agissant de composés isolés et purifiés, la prudence s'impose concernant les modifications éventuellement subies du fait du procédé d'extraction lui-même. L'exemple du cytochrome b_5 (14 -17) est caractéristique de ce point de vue. Par traitement à la trypsine, la protéine isolée paraît répondre au critère d'être typiquement "extrinsèque", alors que son extraction par les détergents (Triton X 100, détergent non ionique) conduit à une forme qu'il convient de qualifier "d'intrinsèque". La situation est, bien sûr, devenue claire lorsqu'une étude comparée des deux formes a révélé que la première ($t - b_5$) était privée d'un fragment "hydrophobe" présent dans la forme ($d - b_5$) isolée à l'aide de détergents. Cet exemple illustre les dangers rencontrés lors de la purification d'espèces membranaires. Une autre conséquence ne se situe pas comme pour le cytochrome b_5 au niveau de la structure primaire mais concerne l'éventualité d'une modification irréversible de conformation conduisant à la perte d'une fonction existant in situ. Par des expériences de "reconstitution", il est néanmoins parfois possible de retrouver cette fonction en réinsérant la protéine "purifiée" dans son environnement d'origine ou dans un environnement synthétique analogue (18, 19).

Une conclusion majeure de ces études des constituants membranaires réside dans le fait que l'activité ne semblait pas, dans bien des cas, être liée à un constituant unique mais exigeait l'existence d'un assemblage. De plus, cette structure devait posséder un ordre bien défini car le mélange au hasard des divers éléments ne donne pas une structure active. Ceci est

particulièrement évident par le fait que dans les expériences de reconstitution, l'ordre d'addition des constituants est souvent très critique. Cette spécificité concernant les associations est nettement perçue dans le cas des activités enzymatiques dites "lipide dépendantes". Des exemples existent qui montrent que le seul changement du degré d'insaturation d'une chaîne d'acide gras dans un phospholipide pouvait faire disparaître l'activité de l'enzyme avec laquelle il est associé (18).

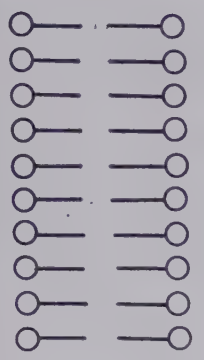
L'importance des interactions intermoléculaires (lipide-lipide, lipide-protéine, protéine-protéine) a constitué le dénominateur commun des différentes hypothèses proposées pour décrire la structure des membranes biologiques.

L'étude de l'étalement en monocouches des lipides du globule rouge conduisit GORTER et GRENDEL au concept du bifeuillet lipidique (20). Ce modèle fut repris par DAVSON et DANIELLI qui y inclurent des protéines adsorbées (21). Le système se présentait alors sous la forme d'un bifeuillet lipidique sur lequel s'adsorbaient des couches non lipidiques (principalement des protéines). Pour ces deux modèles, les lipides s'orientaient tête polaire vers l'extérieur les chaînes hydrocarbonées formant le coeur de la membrane.

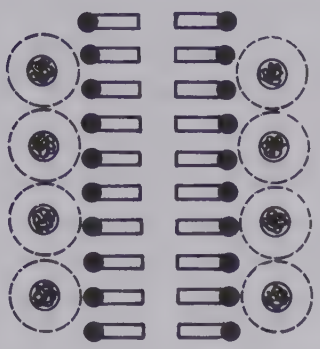
Le modèle du double "sandwich" reçut des confirmations par les travaux de ROBERTSON en microscopie électronique (22), mais l'existence d'un bifeuillet lipidique ne permet pas l'interprétation de toutes les fonctions biologiques. Les phénomènes de transport d'espèces chargées (ions dans le cas de la propagation de l'influx nerveux par exemple) pouvaient difficilement s'expliquer avec ces modèles où était présent un noyau continu hydrophobe. Ce désaccord entre le modèle et le rôle qu'il doit remplir a conduit à de nouvelles hypothèses.

En se fondant sur des données de microscopie électronique et considérant la nécessité d'une structure micellaire pour induire la fusion de deux membranes, LUCY a été conduit à proposer un modèle où coexisteraient, en équilibre dynamique, des structures en bicouches et des micelles sphériques (23). Ce modèle est purement conceptuel et n'a pas reçu de vérifications expérimentales.

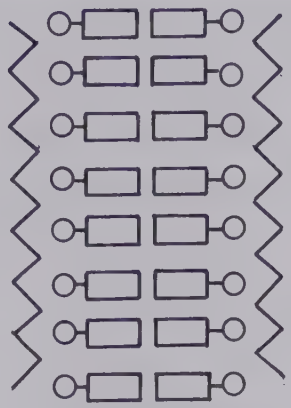
BENSON a proposé un modèle où les interactions entre lipides et protéines sont essentiellement hydrophobes (24). La protéine est alors un élément structural de base de la membrane. DEAMER a suggéré un modèle analogue où une chaîne du phospholipide est liée à la protéine, l'autre étant dirigée vers le noyau de la membrane (25).



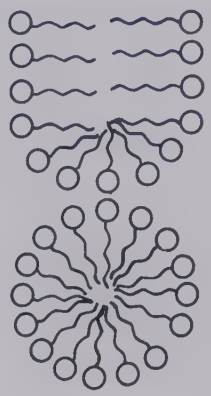
GORTER
GRENDEL



DAVSON
DANIELLI

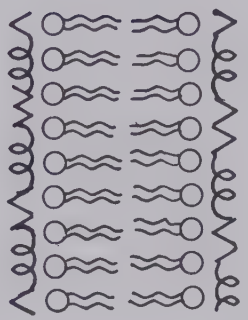


ROBERTSON

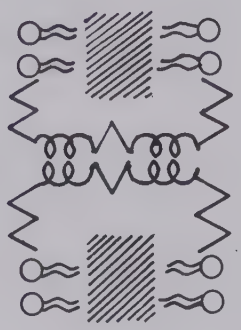


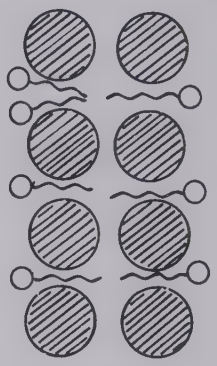
LUCY

BENSON

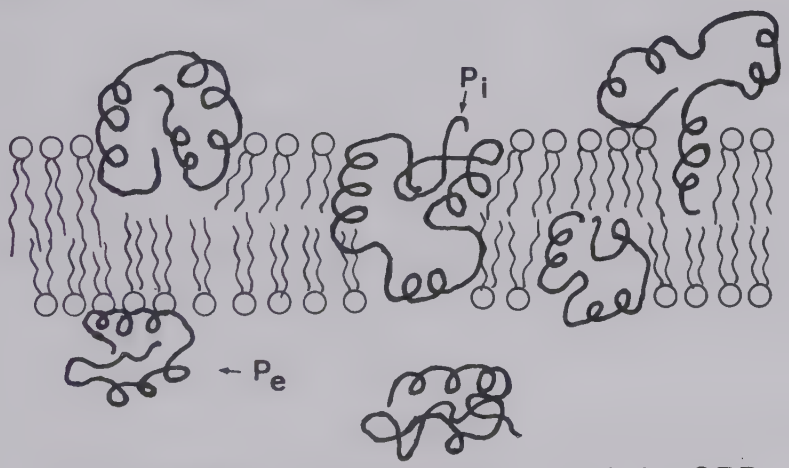


SINGER





GREEN



BOTHOREL, LUSSAN, VANDERKOOI, SINGER

Les concepts de l'organisation des membranes biologiques

FIGURE 1

Les modèles les plus récents comme ceux de BOTHOREL et LUSSAN (26), de SINGER et NICHOLSON (27) ou de VANDERKOOI et GREEN (28) font appel à la coexistence de diverses structures. Le bifeuillet lipidique avec protéines adsorbées serait présent aux côtés de protéines transmembranaires ou intramembranaires auxquelles serait associée une gangue de phospholipides dont les propriétés physiques (configuration, mobilité rotationnelle et diffusionnelle) pourraient être différentes de celles des constituants du bifeuillet. L'existence de cet anneau de phospholipides ceinturant la protéine intrinsèque a été démontrée dans le cas de la cytochrome oxydase (29) mais n'a pu être observée en ce qui concerne la rhodopsine (30).

Les modèles les plus récents mettent l'accent sur le rôle fondamental des interactions lipide-lipide et protéine-lipide et de leur participation à l'élaboration de la structure membranaire et des activités qui lui sont associées.

La définition précise de ces interactions et les conséquences qui en découlent au niveau de l'organisation de la membrane apparaît fondamentale. Les paramètres majeurs nécessaires à la description de ces systèmes sont les termes d'orientation relative des divers constituants et les caractéristiques de mobilité (rotation, translation, échanges entre les deux feuillets ou "flip-flop"). Le facteur orientation est important lorsque l'activité étudiée impose des transferts : transfert transmembranaire dans les phénomènes de transport par exemple, transfert le long d'une face tel celui des électrons dans les mécanismes d'oxydoréduction de la chaîne mitochondriale. Le facteur mobilité apparaît sur deux grandes classes de processus, la "fluidité" des lipides module l'activité d'enzymes "intrinsèques" et les mouvements relatifs des constituants sont essentiels pour les activités qui exigent le voisinage au moins temporaire de ces constituants. Le terme "fluidité" désigne ici l'existence d'une mobilité des groupements constitutifs permettant une grande variété de configurations. Cette propriété est associée à une déstabilisation des interactions lipide-lipide et à une augmentation des libertés de déplacement (rotation, translation) des lipides.

L'étude des cellules entières vivantes par les techniques classiques d'analyse physicochimique (spectroscopie, rayons X) s'avère difficile, sinon impossible (31, 32) et le nombre de variables à maîtriser est considérable, ce qui compromet l'interprétation fine des résultats. Pour cette raison, des assemblages simples, constitués d'un nombre de composants restreint mais possédant néanmoins des analogies profondes de structure avec les systèmes "in vivo", ont été réalisés qui servent de modèles pour aborder l'étude physicochimique de membranes dans leur diversité. De fait, beaucoup de données

descriptives importantes concernant l'organisation des membranes ont pu être acquises grâce à l'expérimentation fondée sur l'utilisation de ces "modèles de membranes".

MEMBRANES MODELES

Les concepts actuels concernant la structure des membranes insistent sur l'importance des interactions entre constituants qui, schématiquement, peuvent être rangées en trois classes : interactions lipide-lipide, lipide-protéine et protéine-protéine. L'étude des deux premières classes peut mettre à profit le caractère amphiphile des phospholipides (33). Dispersés en phase aqueuse, ces composés se réassocient spontanément en structure bilamellaire (23). De tels assemblages sont supposés être présents dans les membranes biologiques et constituent des systèmes physicochimiques assez simples dont l'étude permet d'approcher la compréhension des mécanismes généraux d'interactions présents dans ces structures.

Selon la manière dont les phospholipides sont dispersés dans la phase aqueuse, quatre grands types de systèmes peuvent être réalisés dont les caractéristiques sont bien reproductibles. Dans les paragraphes qui suivent, nous rappellerons leur définition, les traits majeurs décrivant leur organisation ainsi que leurs principales propriétés physicochimiques.

I. COUCHE MONOMOLECULAIRE

Les molécules d'un composé amphiphile déposé à l'interface air-eau se disposent spontanément sous la forme d'une couche monomoléculaire. Dans ces conditions, un feuillet de molécules de lipides en association étroite est formé, les têtes polaires orientées vers la phase aqueuse, les queues hydrophobes tournées vers l'air (fig. 2). Notons que l'air peut être remplacé par un composé organique non miscible à l'eau (34).(Les détails techniques concernant l'obtention de couches monomoléculaires sont fournis en annexe).

- Aire moléculaire .

Les molécules étant disposées en couche monomoléculaire, ce paramètre est égal à l'aire totale abandonnée au film, divisée par le

nombre de molécules de corps étalé qu'il renferme. Ce paramètre est donc imposé par l'expérimentateur qui le contrôle en modifiant soit l'aire totale du film (cuve à barrière mobile) soit le nombre de molécules présentes dans le film. Il faut noter que seul, le système des monocouches permet le contrôle de ce paramètre.

unité : nm^2

- Pression de surface

L'existence d'une interface liquide-vapeur peut être caractérisée thermodynamiquement par l'énergie libre de surface ou tension de surface σ :

$$\sigma = \left(\frac{\partial G}{\partial s} \right)_{T,P}$$

G enthalpie libre du composé
s surface
P pression
T température
unité $mN - m^{-1}$

Elle correspond au travail qu'il faut effectuer pour amener des molécules de l'intérieur de la masse de liquide à la surface. Plusieurs méthodes physiques permettent sa mesure, mais dans le cas qui nous intéresse, seule la technique de la lame de platine mérite d'être retenue (34). En effet, lorsqu'une lame de platine est présente à une telle interface, elle subit une force verticale descendante égale à

$$f = \sigma d$$

f force
d périmètre de l'interface eau-air/lame

Si maintenant un film est déposé à l'interface, les molécules ainsi étalées sont attirées par les molécules du liquide sous-jacent. Il y a donc antagonisme entre force de cohésion du film et force d'ancrage par la sous-phase et en conséquence, modification de l'énergie libre de surface. La pression de surface $\Delta \pi$ est la modification de la tension de surface ainsi

imposée par la présence du film

$$\Delta\pi = \sigma_0 - \sigma$$

σ_0 tension de surface en l'absence de film
σ tension de surface en présence du film
unité $mN.m^{-1}$

Il faut noter que cette définition a été choisie car expérimentalement, il s'avère que la présence d'un film diminue toujours la tension de surface.

La pression de surface est classiquement mesurée selon deux procédés:

- mesure de la modification de la force exercée sur une lame de platine disposée à l'interface par la présence du film, sous réserve que l'angle de contact entre film et lame soit zéro
- mesure de la poussée exercée sur une barrière flottant à l'interface et assurant la séparation étanche entre deux compartiments, l'un où l'interface air/eau est libre, l'autre où elle est occupée par le film (méthode de LANGMUIR).

La pression de surface est une fonction de l'état d'organisation du film que l'expérimentateur peut moduler en modifiant l'aire par molécule. Un ensemble très complexe d'états du film a déjà été décrit (35). Dans le cas qui nous intéresse, nous distinguerons

- état liquide expansé où l'aire par molécule est grande et la pression de surface faible de l'ordre de quelques $mN.m^{-1}$ au plus.
- état gel, l'aire par molécule y est plus faible et limitée par l'encombrement des chaînes hydrocarbonées, la pression de surface peut atteindre plusieurs dizaines de $mN.m^{-1}$.

Il convient de remarquer que bien que ne fournissant pas d'informations précises sur l'état moléculaire, les relations pression de surface-aire moléculaire sont caractéristiques du système film monomoléculaire-sous phase.

- Potentiel de surface

Comme toute surface, une interface air-eau est caractérisée par l'existence d'un potentiel électrique. Par son caractère partiellement polaire,

un amphiphile va modifier ce potentiel. La mesure de ce changement, appelé potentiel de surface, fournit des informations sur l'état d'organisation de la tête polaire et la présence d'une couche de contre-ions (34).

- Radioactivité de surface

La présence de radioisotopes présents au niveau de l'interface peut être dans certains cas spécifiquement décelée et quantifiée. De telles expériences permettent des mesures de dosage au niveau de couches moléculaires (34) comme par exemple lors de l'association de protéines marquées au ^{14}C ou la fixation de l'ion $^{45}Ca^{++}$.

- Méthodes spectrométriques

Des mesures d'ellipsométrie (36), d'absorption de la lumière (34) et de fluorescence (37- 43) sur des couches moléculaires ont été décrites.

II. DISPERSIONS LIPIDIQUES

Les phospholipides dispersés au sein d'une phase aqueuse s'organisent spontanément en structures multibilamellaires qui ne sont pas sans rappeler celle d'un oignon (fig. 2). La présence de bifeuillet phospholipidique où les chaînes hydrophobes sont présentes en contact direct alors que les têtes polaires sont dirigées vers la phase aqueuse, bifeuillet identifié par les clichés de microscopie électronique (23), a conduit à proposer ce système comme membrane modèle (44) puisque son organisation est conforme au modèle de DAVSON et DANIELLI (21).

Les dispersions constituent une suspension de matériel lipidique organisé dans la phase aqueuse et se prêtent à des mesures variées.

Ainsi, la calorimétrie (45) et les mesures spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire, résonance électronique de spin, absorption UV-visible, fluorescence, effet Raman, etc...)(46-48) ont été largement utilisées pour leur étude.

III. MICROVESICULES

Par différentes méthodes (49-55), il est possible d'imposer à une dispersion de phospholipides une structure en bifeuillet simple (fig. 2). Le

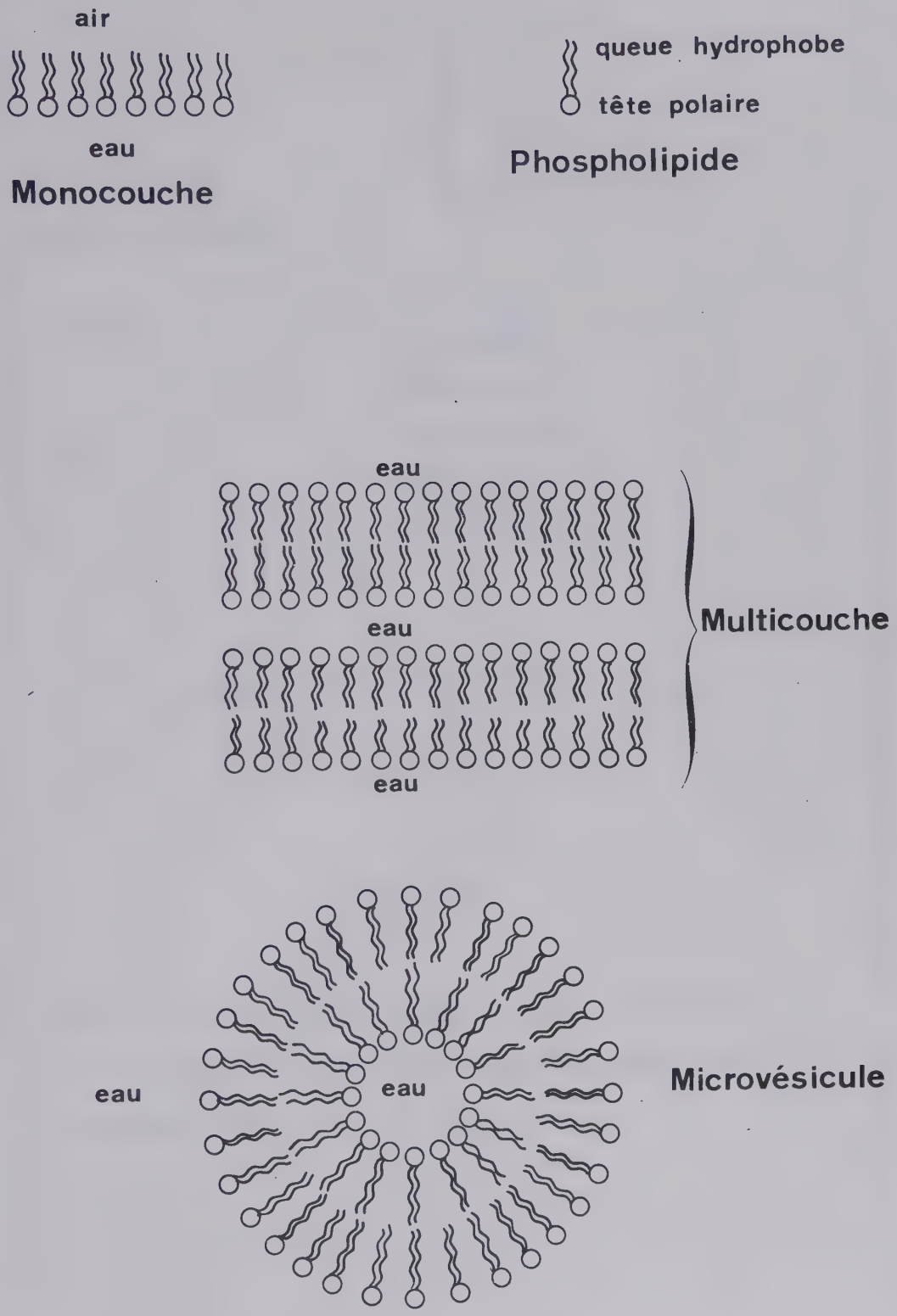
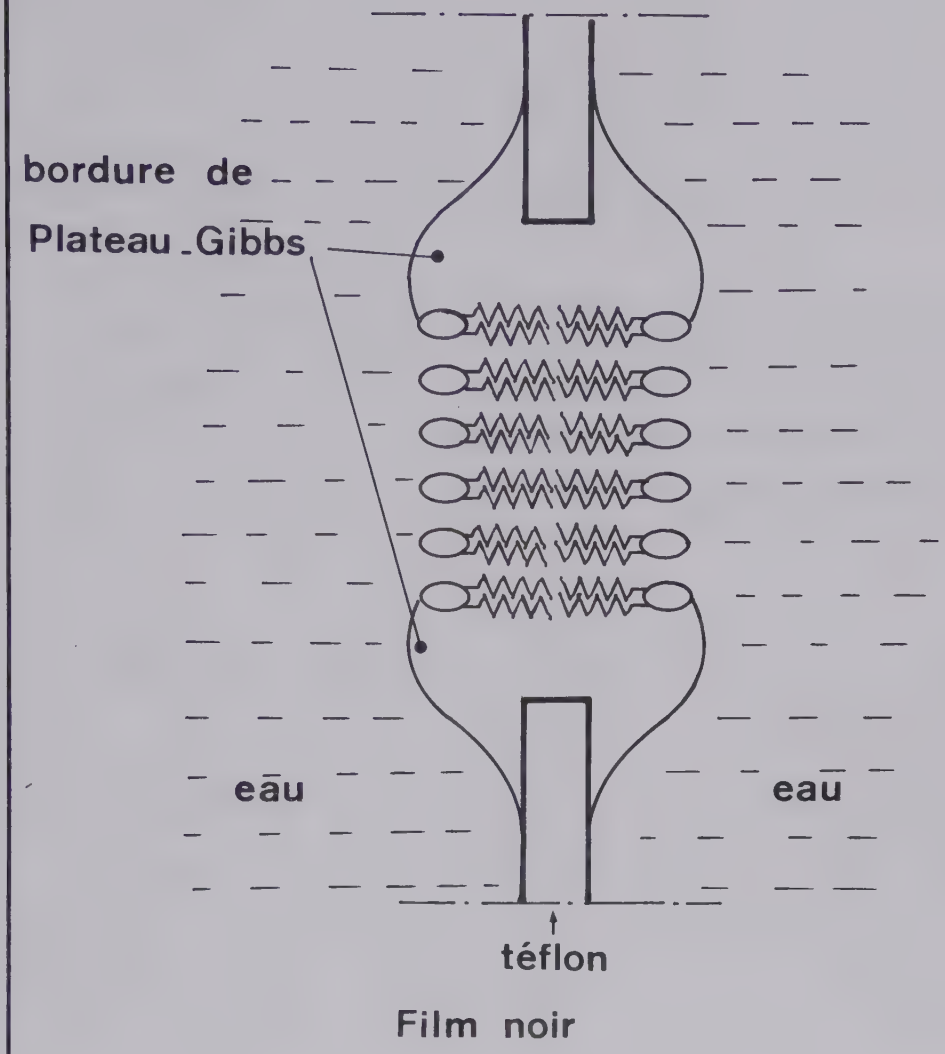

air
eau
Monocouche
queue hydrophobe
tête polaire
Phospholipide
eau
eau
eau
Multicouche
eau
eau
Microvésicule
$\phi_i \simeq 1,2$ nm
$\phi_e \simeq 2,5$ nm

FIGURE 2



-la feuille de téflon n'est pas à l'échelle

-la structure moléculaire de la bordure de Plateau-Gibbs n'est pas connue

FIGURE 3

système se présente alors sous forme de sphères dont la paroi est une bicouche de phospholipides. Il est donc possible d'y distinguer 4 phases : la phase aqueuse externe que l'expérimentateur peut modifier à son gré, le feuillet externe, le feuillet interne, la phase aqueuse interne. La structure exacte de l'assemblage des phospholipides dans de tels systèmes reste mal connue (56-59) (les détails techniques concernant l'obtention de microvésicules sont fournis en annexe).

Ce système permet de réaliser toutes les mesures usuelles applicables à des solutions (46, 47). De plus, la présence d'un seul bifeuillet entre phases aqueuses interne et externe en fait un outil de choix pour l'étude des phénomènes de transport au travers des membranes. De telles mesures sont effectuées soit par la détermination des flux d'espèces radioisotopiques (60), soit à l'aide d'indicateurs de fluorescence (61-63).

IV. FILMS NOIRS OU BLM (Black lipid membranes)

Ce système est constitué par une bicouche simple de phospholipides qui obture un orifice réalisé dans une surface de polytetrafluoroéthylène (Teflon) (64) (Fig. 3). Dans ce cas, la bicouche est plane mais entourée à sa périphérie par un anneau multilamellaire où des quantités importantes de solvant organique sont présentes. De plus, il a été montré que le solvant organique utilisé lors de leur préparation restait en partie inséré au sein du film noir (65)(Les détails techniques concernant la préparation de films noirs sont fournis en annexe).

Le système des BLM offre une grande facilité d'accès aux deux faces du bifeuillet et à la phase aqueuse qui les baigne. En conséquence, il se prête très bien à tous les types de mesures électriques pour lesquelles il a été beaucoup utilisé : mesures de résistivité, de capacité, phénomènes de transport d'espèces chargées (64).

En outre, malgré leur dimension réduite, les films noirs peuvent être analysés par des méthodes d'absorption de la lumière (66) ou de fluorescence (67-70).

V. CONCLUSION

Chacun des différents types de membranes modèles que nous venons

de décrire peut présenter des avantages décisifs lorsqu'il s'agit d'appliquer un type de mesure physicochimique. Ces modèles constituent donc des systèmes permettant des études complémentaires ce qui implique la nécessité de procéder à des corrélations entre modèles quand cette possibilité existe. Ainsi, la radiocristallographie par rayons X n'a été appliquée de façon satisfaisante qu'aux dispersions. De même, seules les expériences utilisant les couches monomoléculaires permettent de contrôler et de modifier à volonté l'aire moléculaire. Ou bien encore, les mesures calorimétriques ont été largement employées avec les dispersions et,déjà plus difficilement (pour des raisons tenant à la concentration de ces suspensions) avec les microvésicules.

Parmi les techniques d'analyses, les mesures de fluorescence s'adaptent particulièrement bien à la variété des types de membranes modèles et également à l'étude des membranes in vivo. C'est cette technique que nous avons utilisée dans le présent travail.

APPLICATION DE LA FLUORESCENCE DANS L'ETUDE DES SYSTEMES MEMBRANAIRES

Différents articles de revue ont largement décrit les possibilités d'étude des membranes biologiques par l'utilisation de l'émission de fluorescence de chromophores présents dans ces systèmes (71-75).

I. THEORIE

I.1. Définition

L'émission de fluorescence est la conséquence de l'un des processus par lequel un électron porté dans un état électroniquement excité par le phénomène d'absorption de la lumière peut revenir vers son état électroniquement fondamental (16).

I.2. Mécanisme

I.2.1. Description

Dans une molécule, les électrons périphériques des atomes sont distribués dans des orbitales. Si la molécule est excitée par l'absorption d'un photon, l'énergie des électrons est accrue, ce qui implique leur changement d'orbitales. Sur le plan des niveaux d'énergie, l'électron quitte le

niveau S_oV_o, S_o, niveau électronique fondamental, V_o, niveau vibrationnel fondamental pour le niveau S_iV_j avec i, j > 0, S désignant un état singulet (77).

Cette transition est très rapide (environ 10^{-15}s). Le système va alors évoluer pour que le niveau d'énergie soit S_1V_o. La durée de cette conversion interne est d'environ 10^{-13}s. L'électron se trouve alors dans un état d'énergie élevée donc thermodynamiquement instable. Divers processus réactionnels existent pour cette désactivation. Nous distinguerons 2 classes de processus: ceux pour lesquels l'électron revient directement au niveau fondamental et ceux pour lesquels il passe par un autre état excité. Pour le premier cas, nous distinguerons

a) le retour non radiatif. L'électron cède son surplus d'énergie au milieu environnant sous forme de chaleur
b) l'émission de fluorescence. Un photon est émis, matérialisant la perte d'énergie de l'électron
c) le transfert d'énergie. Une molécule appelée "inhibiteur" placée au voisinage immédiat de la molécule excitée va accepter l'énergie que cède l'électron lors de son retour au niveau fondamental.

Le second cas correspond à l'existence d'un état triplet, dont le niveau d'énergie est intermédiaire entre celui de S_1 et celui de S_0. La conversion singulet - triplet est théoriquement interdite, c'est à dire peu probable mais peut s'opérer pour une conversion $S_1V_o \longrightarrow T_1V_j$ où l'état triplet est d'énergie plus faible que l'état singulet. Du niveau d'énergie T_1V_j, l'électron par conversion interne aboutit au niveau T_1V_o. Comme énoncé plus haut, la transition T_1V_o vers S_oV_i est interdite mais thermodynamiquement imposée. Le retour vers S_oV_i s'effectuera selon deux schémas analogues à ceux précédemment décrits :

a) retour non radiatif
b) émission d'un photon. Le processus s'appelle dans ce cas phosphorescence.

Le retour de S_oV_i vers S_oV_o s'effectue par un processus de conversion interne précedemment décrit.

L'ensemble de ces processus est illustré dans la figure 4.

I.2.2. Localisation spectrale de l'émission

Sur le plan de l'énergie, le chemin que suit l'électron est fermé,

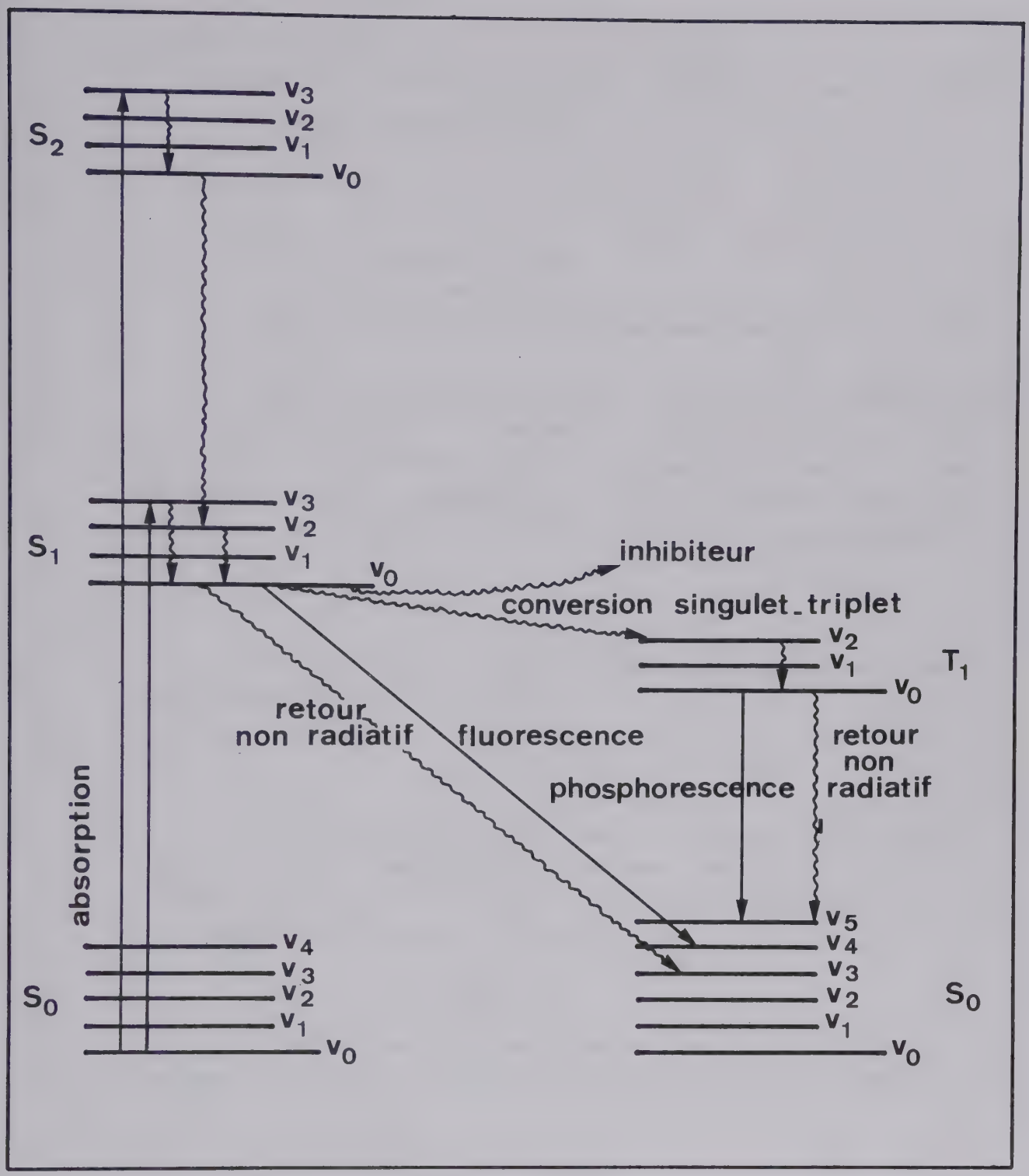

S2
v3
v2
v1
v0
S1
v3
v2
v1
v0
inhibiteur
conversion singulet-triplet
v2
v1
v0
T1
retour
non radiatif
fluorescence
retour
non
radiatif
phosphorescence
absorption
v5
v4
v3
v2
v1
v0
S0
v4
v3
v2
v1
v0
S0

FIGURE 4

il n'y a donc ni perte ni gain d'énergie par la molécule. Elle restitue donc à l'environnement toute l'énergie qui lui a été fournie. L'apport d'énergie est celui du photon absorbé soit d'après la relation d'Einstein

$$\Delta E = h \upsilon_{abs} \qquad (1)$$

ΔE	apport d'énergie
h	constante de Planck
ν_{abs}	fréquence de l'onde lumineuse absorbée

L'électron va restituer cet apport d'énergie par des échanges de chaleur avec le milieu lors des conversions internes et par l'énergie associée au photon de fluorescence si l'électron emprunte ce chemin réactionnel pour revenir au niveau fondamental. Il s'ensuit que l'énergie du photon de fluorescence est plus faible que celle du photon initialement absorbé :

$$\Delta E_{fluo} < \Delta E_{abs} \qquad (2)$$

En conséquence, l'onde lumineuse émise aura une longueur d'onde supérieure à celle de l'onde absorbée :

$$\lambda_{fluo} > \lambda_{abs} \qquad (3)$$

De plus, comme le retour s'effectue vers l'ensemble des niveaux vibrationnels de S_o, l'ensemble des photons émis constitue une population d'énergie différente : la fluorescence présentera une distribution spectrale en longueur d'onde (spectre d'émission).

1.2.3. Durée de vie

Il est admis que chacun des mécanismes postulés pour le retour $S_1V_o \longrightarrow S_oV_i$ obéit à une cinétique du premier ordre d'équation générale :

$$\frac{d\,N(t)}{dt} = - k\,N(t) \qquad (4)$$

N(t)	population de S_1V_o à l'instant t
k	constante cinétique caractéristique du processus de désactivation impliqué.

Il convient de définir 4 constantes de vitesse :

- k_{nr} pour le retour non radiatif
- k_f pour l'émission de fluorescence
- k_{ST} pour la conversion vers l'état triplet
- $k_i(I)$ pour le processus d'inhibition, (I) désignant la concentration en inhibiteur .

Les divers processus sont supposés non compétitifs, d'où l'équation générale :

$$\frac{d\,N(t)}{dt} = -(k_{nr} + k_f + k_{ST} + k_I(I))\,N(t) \qquad (5)$$

dont la solution est

$$N(t) = N_0 \exp(-(k_{nr} + k_f + k_{ST} + k_I(I))\,t) \qquad (6)$$

N_o population de S_1V_0 à l'instant t = 0

La durée de vie τ est, par définition :

$$\tau = \frac{1}{k_{nr} + k_f + k_{ST} + k_I(I)} \qquad (7)$$

I.2.4. Rendement quantique

Le rendement quantique est le rapport du nombre de photons émis par fluorescence au nombre de photons absorbés. Ce dernier est égal à l'ensemble des électrons qui reviennent du niveau S_1V_0 vers S_0V_i puisque l'absorption d'un photon provoque la transition d'un électron vers un état excité, transition qui sera suivie du retour au niveau S_1V_0 par conversion interne. L'équation (5) permet d'évaluer ce nombre de photons absorbés :

$$N_{abs} = \int_0^{\infty} \frac{d\,N(t)}{dt}\,dt \qquad (8)$$

$$= \int_c^{\infty} -(k_{nr} + k_f + k_{ST} + k_I(I))\,N(t)\,dt \qquad (9)$$

Le nombre de photons émis par fluorescence est égal au nombre d'électrons qui retournent en S_0V_i par la voie radiative, soit d'après (4)

$$N_{fluo} = \int_0^{\infty} -k_f \, N(t) \, dt \qquad (10)$$

En conséquence, l'expression du rendement quantique est de la forme :

$$\Phi = \frac{N_{fluo}}{N_{abs}} = \frac{k_f}{k_{nr} + k_f + k_{ST} + k_I(I)} \qquad (11)$$

I.3. Influence de l'environnement

Les molécules de chromophores et de solvant possèdent le plus souvent un caractère dipolaire. Au repos, c'est à dire en l'absence de perturbations externes, leurs dipoles associés sont dans la configuration d'énergie la plus faible, c'est à dire antiparallèles (Fig. 5). Lorsque le chromophore est porté dans l'état excité, la distribution de ces électrons peut être modifiée induisant une réorientation du dipole associé. L'ensemble chromophore à l'état excité, molécules de solvant associées va se réorganiser vers une configuration plus stable, d'énergie plus faible où les dipoles vont reprendre une configuration antiparallèle. Ce mécanisme réclame de l'énergie qui est cédée par le chromophore, d'où une énergie plus faible associée au niveau S_1V_0. Les conséquences sont doubles (76, 78) :

- l'énergie du photon de fluorescence sera plus faible que celle associée au processus dans le cas d'une molécule libre.
- le mécanisme de réorientation des molécules de solvant accroît la probabilité d'existence d'un retour non radiatif et le rendement quantique diminue.

Ces deux effets sont d'autant plus nets que le dipole associé aux molécules de solvant est important, c'est à dire que celui-ci est "polaire".

L'ensemble de ces phénomènes trouve son application dans deux domaines :

- détection de "l'hydrophobicité" de l'environnement du marqueur (79). Plus celui-ci sera polaire, plus le spectre d'émission sera décalé vers le rouge et plus le rendement quantique et par conséquent, l'intensité d'émission, sera faible.
- détection du caractère structuré de l'environnement du chromophore (80, 81). Si le milieu s'oppose à la réorientation des molécules de solvant, le déplacement spectral théoriquement prévu n'aura pas lieu.

Par ailleurs, la composition du milieu peut modifier l'état chimique

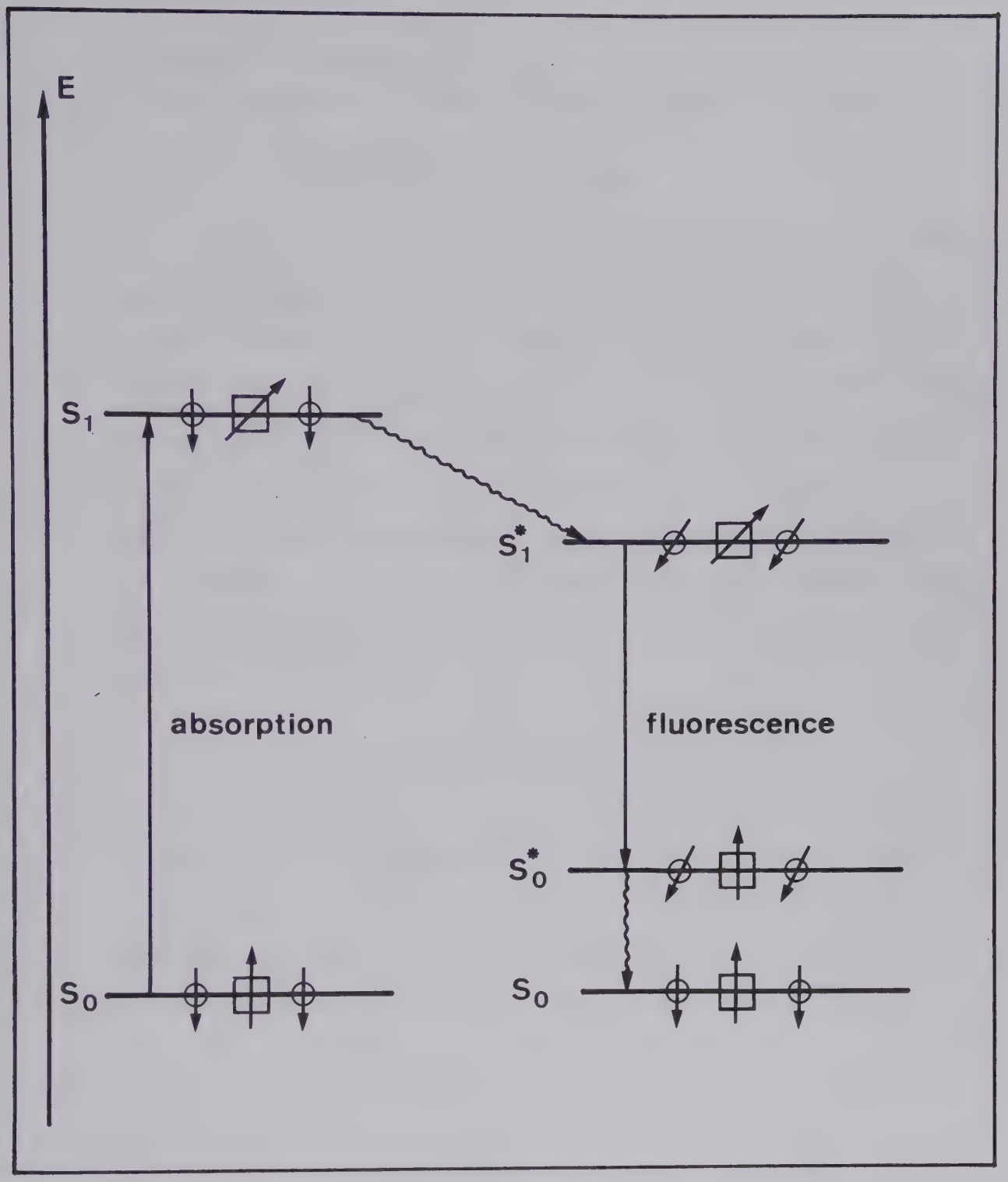


FIGURE 5

du chromophore (ionisation, état d'oxydo-réduction) et par suite ces caractéristiques d'absorption. Ces effets vont modifier l'émission de fluorescence.

I.4. Propriétés de polarisation

Outre son caractère corpusculaire ("photon"), une radiation lumineuse est caractérisée par son champ électrique $\vec{E}$. Cette grandeur, de nature vectorielle, possède une amplitude qui varie sinusoïdalement à la fréquence de l'onde lumineuse. Sa direction, dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation, est soit fixe, l'onde est dite "polarisée rectilignement", soit distribuée au hasard, la lumière est alors dite "naturelle". Lors du phénomène d'absorption, ce champ électrique interagit avec l'oscillateur dipolaire du moment d'absorption du chromophore (77). Cette interaction est du type "dipole-dipole". La probabilité d'absorption est proportionnelle à $\cos^2 \theta$ où θ désigne l'angle entre champ électrique et oscillateur dipolaire. Lors du phénomène d'émission, le champ électrique de l'onde lumineuse de fluorescence est parallèle à l'oscillateur dipolaire du moment d'émission du chromophore. Son orientation est donc caractéristique de la position du chromophore au moment de l'émission.

I.4.1. Application aux mesures de mobilité

Les orientations relatives des moments d'absorption et d'émission sont fixes dans la molécule. La détermination de la distribution des orientations des champs électriques des ondes émises, c'est à dire de l'état de polarisation de la lumière de fluorescence, va, dans le cas d'une solution, permettre la détermination de la mobilité du chromophore. Les calculs théoriques (82 - 85) pour le cas d'une observation faite selon une direction perpendiculaire à la lumière incidente conduisent à la relation de Perrin :

$$\frac{1}{P} \pm \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left(1 + 3 \frac{\tau}{\rho} \right) \qquad (12)$$

avec

$$P = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H} \qquad (13)$$

où p est la polarisation :

$$\rho = \frac{3\eta V_0}{RT} \qquad (14)$$

P_o est la polarisation intrinsèque, c'est à dire en l'absence de mouvement du chromophore

τ la durée de vie de l'état excité.

ρ le temps de relaxation du chromophore.

R la constante des gaz parfaits

T la température absolue.

η la viscosité de l'environnement

V_0 le volume de la sphère équivalente au chromophore

I_V l'intensité lumineuse de fluorescence dont le champ électrique est perpendiculaire à la direction d'excitation.

I_H l'intensité lumineuse de fluorescence dont le champ électrique est parallèle à la direction d'excitation.

Il faut noter que ces mesures statiques ne renseignent que sur le mouvement global du chromophore mais en aucune manière, sur son éventuelle anisotropie (86 - 89).

I.4.2. Détermination de termes d'orientation

Dans le cas de systèmes où le chromophore ne possède qu'une mobilité restreinte (films de polymère, membranes), l'analyse du caractère polarisé de la lumière réémise permet de déterminer la distribution des orientations du chromophore au sein du système (90 - 97).

I.5. Transfert d'énergie

Ce mécanisme d'inhibition de fluorescence permet la détermination du caractère de voisinage entre deux espèces : le donneur, qui est le chromophore excité et l'accepteur (98). Le surplus d'énergie que possède le donneur à l'état excité est transféré à l'accepteur par un transfert de résonance. L'électron dans un état excité induit un champ électrique oscillant qui peut entrer en résonance avec la molécule d'accepteur si celle-ci possède une transition énergétique convenable. L'accepteur se trouve alors porté dans un état excité. Son retour vers l'état fondamental peut s'effectuer avec émission d'un photon, la fluorescence sera dite induite.

Ce mécanisme obéit au schéma :

$D + h\nu_{abs} \rightarrow D^*$	absorption	(15)
$D^* \rightarrow D + h\nu_{fluo}$	fluorescence	(16)
$D^* \rightarrow D$	désactivation non radiative	(17)
$D^* + A \rightarrow D + A^*$	transfert d'énergie	(18)
$A^* \rightarrow A$	désactivation non radiative	(19)
$A^* \rightarrow A + h\nu$	fluorescence induite	(20)

Ce transfert d'énergie se traduit par une diminution de la fluorescence émise par le donneur D selon la loi de Perrin (98)

$$\frac{I}{I_0} = \frac{R^6}{R^6 + R_0^6} \qquad (21)$$

- I fluorescence observée en présence de l'accepteur A
- I_0 fluorescence observée en l'absence de l'accepteur A
- R distance entre le donneur et l'accepteur
- R_0 distance caractéristique.

R_0 peut être déterminé théoriquement et dépend des caractéristiques du couple accepteur donneur :

$$R_0 = (\kappa^2 Q_0 J n^{-4})^{1/6} \times 9{,}79\ 10^3 \quad (Å) \qquad (22)$$

où

- Q_0 est le rendement quantique du donneur seul.
- n l'indice de réfraction du milieu
- J l'intégrale de recouvrement
- κ le paramètre d'orientation.

L'intégrale de recouvrement mesure l'étendue du recouvrement entre spectre d'émission du donneur D et spectre d'absorption de l'accepteur A. Son expression est donnée par :

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda)\ \varepsilon(\lambda)\ \lambda^4\ d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \qquad (23)$$

avec :

$F(\lambda)$ intensité de fluorescence émise à la longueur d'onde par le donneur

$\varepsilon(\lambda)$ coefficient d'absorption moléculaire de l'accepteur à la longueur d'onde .

Le coefficient d'orientation K est une fonction de l'orientation relative des moments de transition d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. Son expression découle de la théorie de l'énergie d'interaction entre dipoles :

$$K = \vec{D}.\vec{A} - 3(\vec{A}.\vec{R})(\vec{D}-\vec{R}) \qquad (24)$$

où

$\vec{D}$ désigne le vecteur unitaire sur l'axe support du moment d'émission.

$\vec{A}$ le vecteur unitaire sur l'axe support du moment d'absorption

$\vec{R}$ le vecteur unitaire sur l'axe joignant les points d'application de ces deux moments.

Le contrôle expérimental de cette théorie dans le cas de systèmes à caractère biologique en a montré le bien-fondé (99 - 102).

II. ASPECTS PRATIQUES DE LA FLUORESCENCE

II.1. Avantages

Ceux-ci se situent sur deux plans. Le premier découle directement de l'aspect théorique que nous venons de décrire. L'autre est lié à l'aspect technologique des mesures de fluorescence.

II.1.1. Richesse de l'information

La fluorescence est susceptible de fournir des informations sur :

- l'environnement du chromophore.
- son état physico-chimique.
- sa mobilité.
- son orientation.
- son voisinage.

II.1.2. Sensibilité de la méthode

L'émission de fluorescence est liée linéairement à la concentration de chromophores pour les faibles valeurs de celle-ci, ainsi qu'à l'intensité du flux incident (76) :

$$I_f = I_0 k\varepsilon c \phi \qquad (25)$$

avec

I_0	intensité incidente
k	constante d'appareil
ε	coefficient d'absorption moléculaire
c	concentration en chromophore
ϕ	rendement quantique.

La localisation spectrale de l'émission, le plus souvent située dans le proche UV ou le visible, permet l'emploi de détecteurs particulièrement sensibles et de faible bruit. Des concentrations extrêmement faibles de chromophores pourront donc, en général, être utilisées avec un signal de fluorescence notable (103 - 106).

II.2. Inconvénients et limites

Ils sont essentiellement d'origine moléculaire. En effet, pour de nombreux composés, la fluorescence n'est pas décelable, soit que le rendement quantique est trop faible, soit que la transition d'absorption est peu favorable (mauvaise localisation spectrale, faible coefficient d'absorption moléculaire). Tel est le cas des acides aminés dont seuls trois sont fluorescents (Tryptophane, Tyrosine, Phenylalanine) ou des phospholipides. Dans le cas d'espèces faiblement fluorescentes, l'utilisation de concentrations élevées peut être une solution mais deux phénomènes s'opposent souvent à la bonne marche de ce procédé. Le chromophore peut absorber la lumière incidente et limiter ainsi son action excitatrice sur les autres molécules de chromophore, c'est le "filtrage interne". Aux fortes concentrations, des réactions d'auto-association donnant des dérivés non fluorescents ou des désactivations non radiatives peuvent se produire :

$$D + h\nu_{abs} \rightarrow D^* \qquad \text{Absorption} \qquad (26)$$

$D^* \rightarrow D + h\nu_{fluo(monomère)}$	Fluorescence	(27)
$D^* + D \rightarrow D_2^*$	Association	(28)
$D_2^* \rightarrow D + D$	Désactivation non radiative	(29)
$D_2^* \rightarrow D + D + h\nu_{fluo(dimère)}$	Fluorescence	(30)

Notons que les émissions associées aux équations (27) et (30) ne s'effectuent pas nécessairement aux mêmes longueurs d'onde (107 - 109).

Lorsque le système étudié ne comporte aucune espèce fluorescente, il peut être fait appel à l'introduction de groupes marqueurs fluorescents. Ces groupes fonctionnels peuvent être éventuellement intégrés de manière covalente (102, 110) ou être des molécules fluorescentes associées de manière non covalente (79). Leurs caractéristiques d'émission, "sensibles" à l'environnement, serviront d'indicateur. Cette stratégie dérive du concept général d'utilisation de "groupes rapporteurs" qui a été appliquée à des techniques variées. Dans cette démarche, il convient de garder présente à l'esprit la limite d'utilisation qui tient au fait que le marqueur lui-même est susceptible de perturber l'environnement dont il est censé pouvoir révéler les caractéristiques et les changements.

ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA DYNAMIQUE DE MEMBRANES MODELES

L'évolution de l'organisation et du mouvement de phospholipides au sein d'un feuillet lipidique monomoléculaire a été étudiée en fonction de l'aire moléculaire par des méthodes de fluorescence. A partir des résultats obtenus sur ce type de modèle, l'analyse a été étendue aux microvésicules et dispersions.

Les lécithines ou phosphatidylcholines (Fig. 6) sont des constituants phospholipidiques majeurs présents dans la plupart des membranes. Ces composés présentent des degrés d'insaturation divers au niveau des chaînes carbonées. Pour des milieux dont le pH est voisin de la neutralité, la tête polaire possède une charge globale nulle par suite de l'effet de compensation entre groupes choline et phosphate.

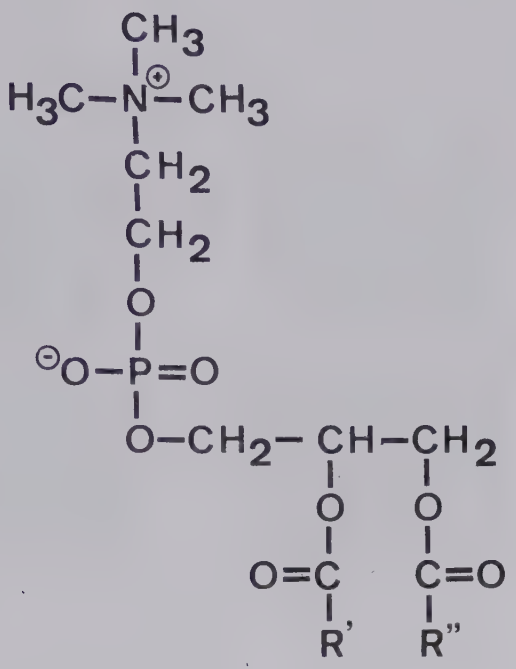
Lorsque leurs chaînes sont saturées, les lécithines peuvent présenter le processus dit de "transition de phase". Celui-ci peut être induit soit thermiquement (48), soit par modification de l'aire moléculaire (34, 111). Dans le cas de systèmes bilamellaires (microvésicules, dispersions), le processus est déclenché par effet thermique. Les caractéristiques du phénomène ont été étudiées par des techniques diverses : rayons X (112, 113), RMN (114), RPE (116), fluorescence (117 - 129), absorption ultra-sonore (130), turbidité (131, 132), effet Raman (133, 134) et calorimétrie (113, 115, 118, 121, 45, 135). Dans tous les cas, les auteurs ont conclu à l'existence d'une restructuration des chaînes hydrocarbonées (Fig. 7) avec les conséquences suivantes :

- leur orientation relativement au plan de l'interface est modifiée
- le nombre de coudes dans la chaîne augmente; à basse température, une conformation toute trans étant détectée.
- la "fluidité" de la matrice lipidique est accrue.

Les informations structurales concernant le groupe glycérol et la partie "polaire" (groupe phosphate, groupe choline) sont plus rares. Quelques données de RMN (114) et de fluorescence (122, 124, 125) peuvent être trouvées dans la littérature concernant ce problème.

Par l'utilisation de marqueurs de la zone glycérol (dansylphosphatidyléthanolamine) et de l'interface eau/tête polaire (anilinonaphtalene) (136 - 139), la technique des couches monomoléculaires nous a permis une étude détaillée de ce problème (articles -). L'extension de telles études à d'autres modèles de membranes a été réalisée dans le but d'établir les corrélations entre ces divers systèmes.

Les évènements cinétiques intervenant dans le domaine de la transition de phase peuvent être suivis par l'utilisation de la relaxation thermique.



Phosphatidylcholine

FIGURE 6

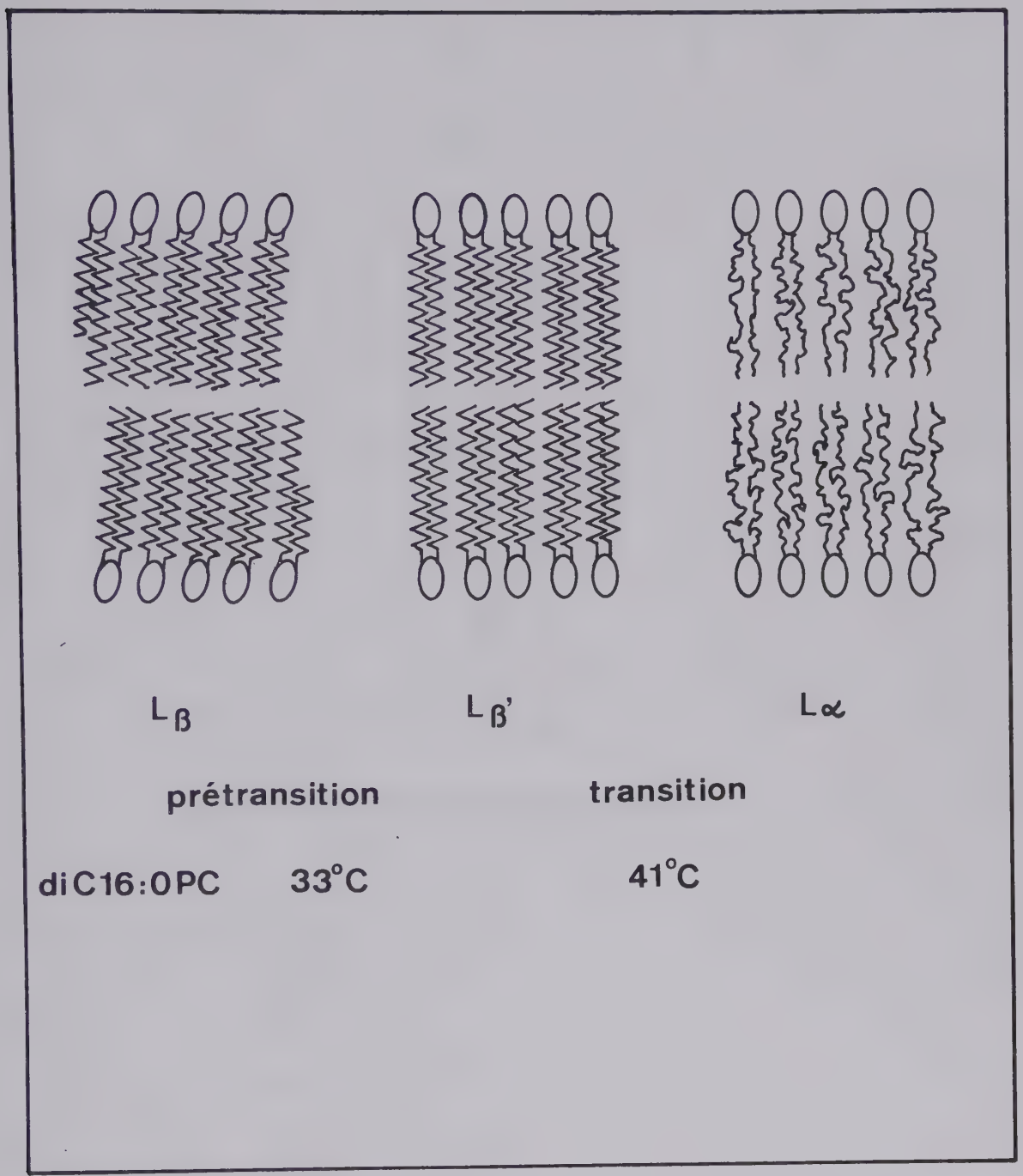
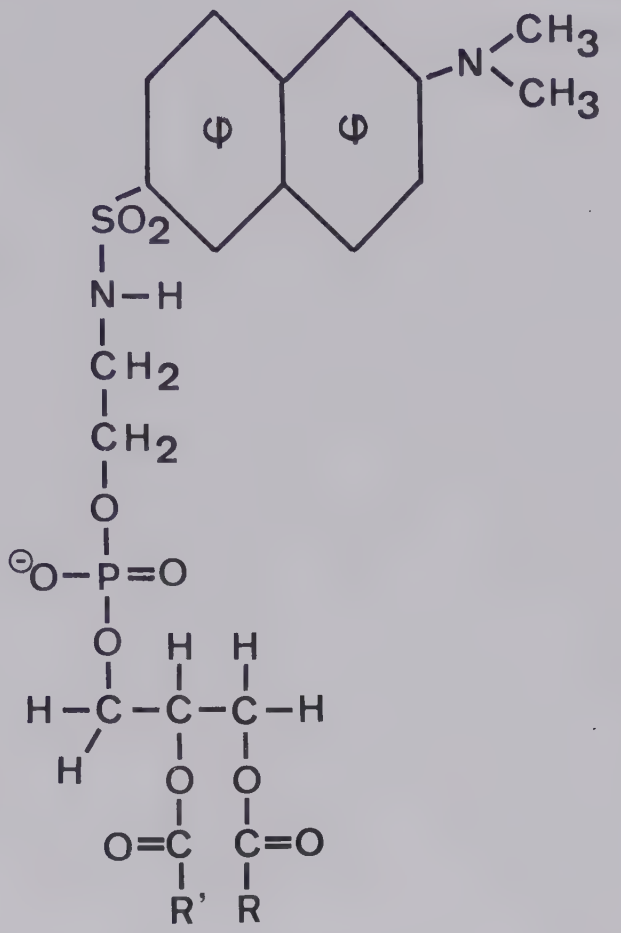
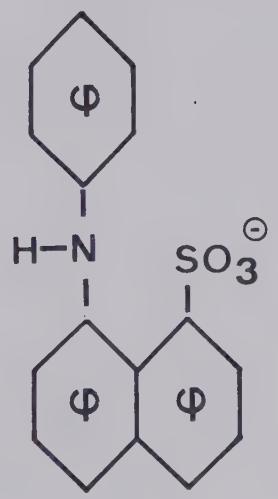

L_β
$L_{\beta'}$
L_α
prétransition
transition
diC16:0PC
33°C
41°C

FIGURE 7



Dansylphosphatidyléthanolamine

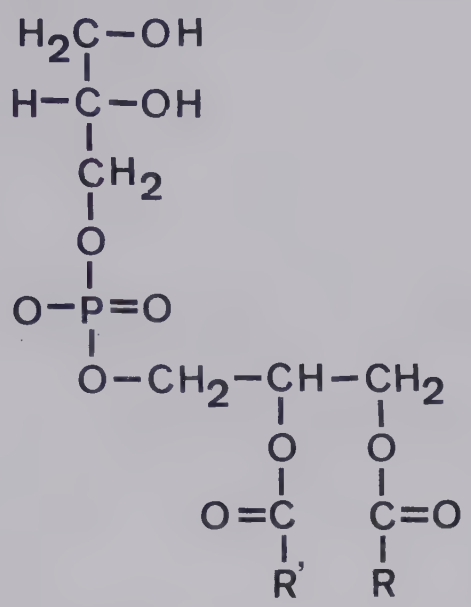


1-8 Anilinonaphtalène sulfonate

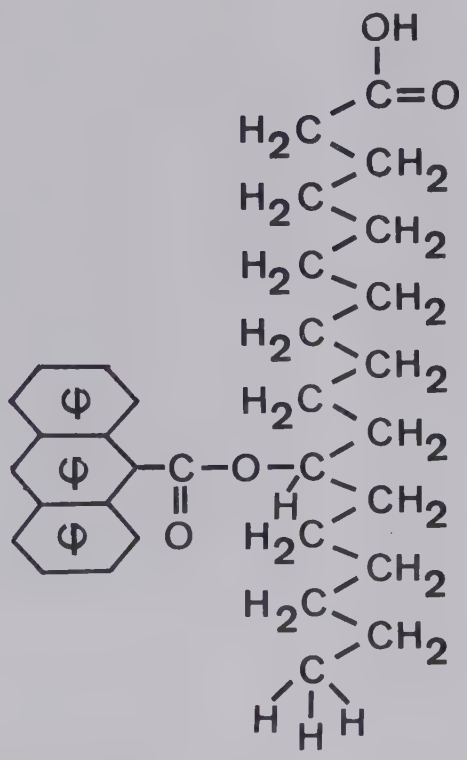
FIGURE 8

A la différence des études d'autres auteurs (140 - 144) où le mode de détection est la turbidimétrie, le spectrofluorimètre de relaxation thermique mis au point dans notre Centre (Annexe 4) permet la détection par mesure de fluorescence. Le choix d'une méthode différente d'analyse permet d'espérer révéler spécifiquement certaines composantes de remaniements structuraux.

Un aspect fondamental de la dynamique des assemblages organisés de phospholipides concerne des mouvements de translation ou "diffusion latérale". La méthode dite de "retour de fluorescence après photo-aveuglement" (145 - 154) a pu être utilisée avec profit dans le cas des couches monomoléculaires (article). Nous avons élaboré un mode d'exploitation des résultats conduisant à un calcul des valeurs de coefficients de diffusion dans le plan. Une application de cette démarche a consisté en l'étude du phosphatidylglycérol (Fig. 9), phospholipide chargé électriquement, et a permis de montrer une modulation de la vitesse de diffusion latérale par les ions présents dans la surface aqueuse.



Phosphatidylglycérol



acide 12 (9-anthroyl) stéarique

FIGURE 9

Volume 70, number 1 FEBS LETTERS November 1976

PHASE TRANSITIONS IN PHOSPHOLIPID MONOLAYERS AT THE AIR–WATER INTERFACE: A FLUORESCENCE STUDY

J. TEISSIÉ, J. F. TOCANNE and A. BAUDRAS

Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S., 118, Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, – France

Received 3 August 1976

1. Introduction

In the last few years, fluorescent probes have proved to be powerful tools in elucidating several aspects of the dynamics of phospholipids in biomembranes. The main body of investigation has been carried out either on biomembranes [1,2] or on membrane models such as phospholipid dispersions in water (liposomes) [3–5]. In these materials, it is extremely difficult to have any control on the molecular packing of the phospholipids. Instead, monomolecular films of lipids spread at the air–water interface are interesting membrane models from this point of view since molecular packing is easily controlled in addition to temperature, subphase pH and ionic strength and composition. The aim of this paper is to report on fluorescence experiments on lipid monolayers at the air–water interface using an apparatus specially designed in our laboratory. Transitions from liquid–crystal to gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine have been revealed by using the fluorescent probes DPE, DPH and AS*. The phase-dependent fluorescence properties observed can be accounted for by environment modifications and/or reorientations of the probes and are discussed with regard to data already inferred from experiments on phospholipid dispersions in water.

Abbreviations used: DPE, dansylphosphatidylethanolamine; DPH, diphenyl hexatriene; AS, 12(9-anthroyl)stearic acid; DPC, dipalmitoylphosphatidylcholine.

2. Materials and methods

2.1. *Chemicals*

DPC and AS were purchased from Sigma (USA) and DPH from Fluka (Switzerland). DPE was a generous gift from Dr Lussan (Bordeaux, France). All these compounds were pure as considered by thin layer chromatography and were used without further purification. Salts were of analytical grade. Ultra pure water for semiconductor industry (Motorola, Toulouse, France) was used throughout the experimentation. Solvents were spectroscopically pure.

2.2. *Monolayer and fluorescence experimentation*

The experimental procedure for surface pressure measurements, including the Langmuir moving-barrier automated apparatus of our own design, will be described in Chem. Phys. Lipids [6]. Pure DPC or DPC–probe mixtures in the molar ratio 99:1 were dissolved in an hexane–ethanol solvent mixture (9:1 v/v). For fluorescence experimentation, the film pressure was raised stepwise, at constant area, by consecutive additions of the lipids using a cylindrical trough (ϕ = 5 cm; h = 2 cm). Fluorescence was measured with an apparatus specially devised by one of us (J. Teissie) which will be described elsewhere in which the relative angle between the excitation and observation light beams is 45°, the axis of observation being perpendicular to the film surface (fig.1). For each measurement of fluorescence intensity, a 30 s illumination period was used after which time the film was allowed to rest in the dark in order to avoid any photo-degradation. Signal-to-noise ratio was 50 typically and reproducibility within 5%. In all experiments temperature was 20.0 ± 0.5°C.

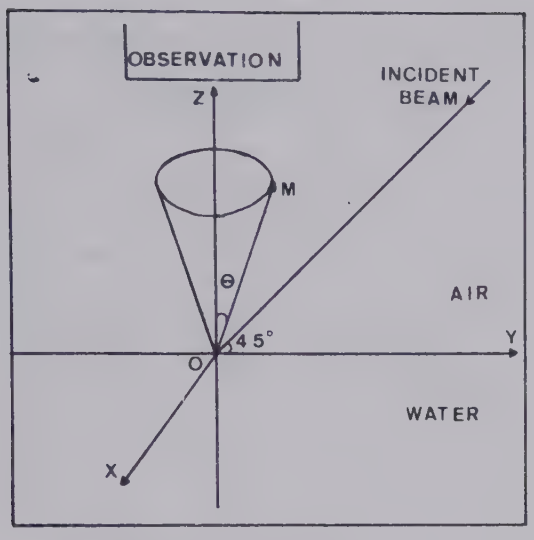


Fig.1. Fluorescence measurements on monolayers: schematic drawing of the geometrical disposition.

3. Results

3.1. *Compression isotherms*

A typical compression isotherm of DPC recorded through continuous film compression is shown in fig. 2A. Along the curve, nearly identical to those already described [7], the gas–liquid ($\pi < 0.2$ dyne/cm), liquid–crystal ($0.2 < \pi < 6$ dyne/cm; molecular area 75 Å^2 at $\pi = 4$ dyne/cm) and gel ($\pi > 8$ dyne/cm; molecular area 46 Å^2 at $\pi = 20$ dyne/cm) phases of the film are clearly observable, the intermediate plateau region being specific of the liquid–crystal to gel phase transition.

The experimental points observed during step-wise compression with the fluorescence trough (triangles in fig.2A) fit satisfactorily the preceding continuous curve, particularly the different states of the film are still recognizable.

The compression isotherm of DPC was not perturbed at all when any of the three probes used was present in the film (molar ratio 99:1).

3.2. *Fluorescence experiments*

No fluorescence signal could be detected with films of pure DPC whatever their compression state.

It is currently accepted that due to its chemical structure DPE inserts between the phospholipid molecules and probes for the polar head region [8]. As observed in fig.2B, the reduced fluorescence intensity (fluorescence signal divided by the number of probe molecules; doing so it is assumed that the probe is distributed at random in the film) increases sharply (by 60%) at the beginning of the liquid–crystal to gel phase transition. Reorientation of the optical transition moments and changes in the environment of the probe can occur concurrently and be responsible for the

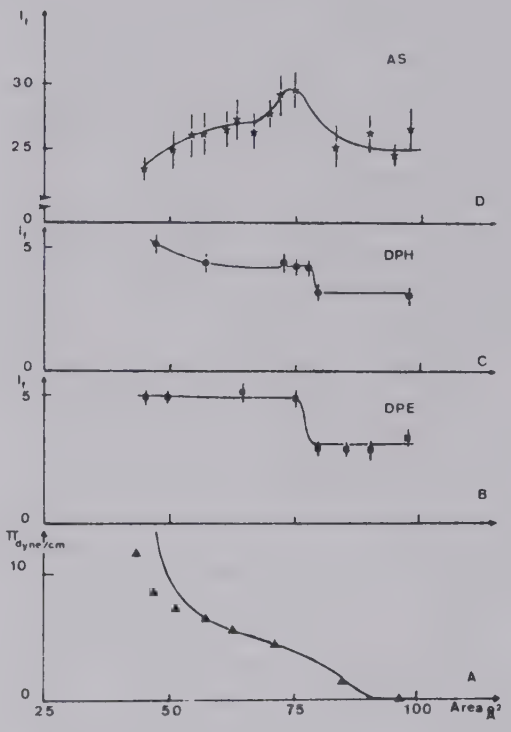


Fig.2. Phase transitions of DPC monolayers. Liquid subphase is 0.1 M NaCl, pH 6.0. (a) Surface pressure measurements with continuous compression (full line) and stepwise compression (triangles); (B – D) changes of the reduced fluorescence intensity (arbitrary units) during stepwise compression of DPE, DPH and AS respectively. Excitation wavelengths are 347 nm ($\Delta\lambda$ = 20 nm) for DPE and DPH and 360 nm ($\Delta\lambda$ = 60 nm) for AS. Observation wavelengths are 498 nm ($\Delta\lambda$ = 10 nm) for DPE and 476 nm ($\Delta\lambda$ = 10 nm) for DPH and AS. Abscissa scale is area per molecule. Error bars show the standard deviation observed with a minimum of six determinations.

Table 1
Spectral distribution of the emission of DPE embedded in a DPC monolayer in expanded state (π = 3 dyne/cm) and in condensed state (π = 10 dyne/cm)

λ (nm)	476	498	519	544
I_3	4	10	8.5	4
I_{10}	12.2	20	10	5
Ratio I_{10}/I_3	3.05	2.0	1.2	1.25

Subphase is 0.1 M NaCl, pH 6.0. I_3 and I_{10} (arbitrary units) are reduced fluorescence intensities observed at surface pressure* π = 3 dyne/cm and π = 10 dyne/cm respectively. I values were not corrected for wavelength dependence of the apparatus sensibility. Spectra bandwidth of the filters used is $\Delta\lambda$ = 10 nm. Standard error is 0.2. Excitation wavelength is 347 nm ($\Delta\lambda$ = 20 nm).

observed behavior. To decide on the relative weight of these factors, a spectral analysis of the emitted signal was carried out by comparing the fluorescence properties of the film in the expanded state (π = 3 dyne/cm) and in the condensed state (π = 10 dyne/cm). From the changes of the fluorescence signal ratio I_{10}/I_3 as a function of emission wavelength (table 1), it can be inferred that a blue shift is brought about on condensing the lipid film. This suggests that part of the enhancement of DPE fluorescence is due to environmental changes along the phase transition. Orientation factors might be quantitated directly in the near future with equipment of our fluorometer for anisotropy measurements.

Due to its hydrophobic character, DPH is considered as probing for the lipid hydrocarbon chains [3]. Its behavior is very similar to that of DPE as the liquid–crystal to gel phase transition is triggered (fig.2C) though the fluorescence increase in somewhat smaller (30%).

The fluorescent moiety of AS is also embedded within the acyl chains of the lipid but now at a fixed distance from the interface since its hydrophilic carboxyl group is supposed to anchor at the polar head–water interface [8]. As shown in fig.2D, the behavior of the fluorescence signal of AS upon film compression is strongly different from that observed with both DPE and DPH. The fluorescence of the probe is enhanced once more in the region of the liquid–crystal to gel phase transition, but to a lesser extent (15%), then progressively decreases towards its original value (in the limit of compressions allowed). This peculiar biphasic profile of the fluorescence response of AS was substantiated by numerous measurements, the subphase ionic environment being either 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, or 20 mM NaCl, pH 3.0.

4. Discussion

Although DPE, DPH and AS probe for different regions in the phospholipid monolayer, all display an increase of their fluorescence signal as the DPC film starts to condense from the liquid–crystal to the gel phase. This phenomenon can be accounted for either by environment modifications and/or reorientation of the probe. The influence of environment follows the Franck–Condon principle; in other words any modification of the physical state of the lipid in the monolayer, in modifying the solvent cage around the probe and then the associated relaxation processes, can bring about a change in its quantum yield and a shift of its maximum emission wavelength. Changes in the environment can be regarded as depending upon a change in the solvation of the lipid polar heads at the interface [9] or as a modification of the fluidity of the aliphatic chains within the lipid matrix. Recent developments in the field of membrane structure clearly suggest, however, that the two concepts are closely intertwined [10]. The blue shift observed in the emission spectrum of DPE as DPC condenses is characteristic of a modification of the environment of the probe.

Furthermore, the geometric relationship between the orientation of the molecules in the monolayer and that of the axes of the optical system in the apparatus (fig.1) allows for detection of probe reorientation. Indeed, let us assume that the absorption and emission moments lie along the main axis OM of the probe. The axial symmetry of the monolayer system allows the probe molecule to be regarded as distributed on a cone centered on the Oz axis, the angle θ being specific of a given molecular orientation. With this model, it is easily demonstrated that the observed fluorescence intensity depends on this angle according to the equation:

$$I = K\left(1 + \frac{\sin^2\theta}{2}\right)\sin^2\theta \qquad (1)$$

In thermal transitions of DPC dispersions in water, changes in fluorescence intensity of the probes have been reported to be 20% and 10% with DPE and DPH respectively [3,5] and are attributable to environment changes only since the distribution of axes in microvesicles is at random. The higher values observed with monolayers, 60% and 30% respectively, make it reasonable to propose (through equation (1)) that probe reorientation does occur and is responsible for the difference observed in the fluorescence enhancement factor. Evidence for molecular reorientations correlated with phase transition have been reported for DPC multilayers either by fluorescence techniques [3] or by X-ray [11] and electron [12] diffraction studies.

As far as AS is concerned, an interpretation of the complex fluorescence transition observed is premature; however, it is worth noting that a similar behavior has been very recently reported for AS in microvesicles of DPC [4]. The fluorescence decrease observed in the high pressure region of the compression isotherm might correlate with AS segregation in microdomains; such a phase separation of AS has been already suggested [13] and is currently under investigation.

References

[1] Kasai, M., Changeux, J. P. and Monnerie, L. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 420–427.
[2] Patrick, J., Valeur, B., Monnerie, L. and Changeux, J. P. (1971) J. Membr. Biol. 5, 102–119.
[3] Andrich, M. P. and Vanderkooi, J. M. (1976) Biochemistry 15, 1257–1261.
[4] Bashford, C. L., Morgan, C. G. and Radda, G. K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 157–172.
[5] Faucon, J. F. and Lussan, C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 307, 459–466.
[6] Sacré, M. M. and Tocanne, J. F., Chem. Phys. Lipids, in press.
[7] Phillips, M. C. and Chapman, D. (1968) Biochim. Biophys. Acta 163, 301–313.
[8] Waggonner, A. S. and Stryer, L. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 579–589.
[9] Jendraziak, G. L. and Mendible, J. C. (1976) Biochim. Biophys. Acta 424, 133–148.
[10] Jendraziak, G. L. and Hasty, J. H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 348, 45–54.
[11] Rand, R. P., Chapman, D. and Larsson, K. (1974) Biophys. J. 15, 1117–1124.
[12] Hui, S. W. (1976) Chem. Phys. Lipids 16, 9–18.
[13] MacGrath, A. E., Morgan, C. G. and Radda, G. K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 173–185.

ORIENTATION PROCESSES INDUCED BY PHASE TRANSITIONS OF PHOSPHOLIPID MONOLAYERS SPREAD AT THE AIR/WATER INTERFACE : A FLUORESCENCE STUDY WITH POLARIZED INCIDENT LIGHT.

TEISSIE J.

Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires
du C.N.R.S.
118, Route de Narbonne - F 31077 TOULOUSE CEDEX - FRANCE.

Running title:
Fluorescence study of monolayers phase transitions.

RESUME

Les transitions de phase de monocouches de dipalmitoylphosphatidylcholine étalées à une interface air/eau ont été observées par spectroscopie de fluorescence. Tirant avantage de la symétrie axiale du système, l'utilisation d'une lumière incidente polarisée peut révéler des changements d'orientation du marqueur dansylphosphatidyléthanolamine, spécifique des têtes polaires.

Ces expériences ainsi que les données fournies par la littérature permettent de conclure que l'orientation moyenne du marqueur n'est pas modifiée lors du processus de transition de phase. Par contre, l'écart moyen de la fonction de distribution de l'orientation décroît lors du passage de l'état liquide expansé à l'état condensé. L'état gel doit donc être considéré comme de nature structurée et rigide.

SUMMARY

Phase transitions in monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine spread at the air/water interface were studied by means of fluorescence measurements.Using linearly polarized incident light and following the behaviour of a fluorescent probe (Dansylphosphatidylethanolamine),it was possible to obtain informations about the orientation changes at the polar head level.

From these experiments and from results already published it is concluded that the main orientation of the probe remained unchanged during the phase transition process.On the other hand the standard deviation of the distribution function of orientations is larger in the liquid expanded state relative to the condensed state.The gel state can be considered as rather structured and rigid.

I- INTRODUCTION.

In the last few years, dynamic aspects of the behaviour of phospholipids in biomembranes were successfully investigated by use of fluorescence probes. Classical observations reported on biological membranes [1,2] and on phospholipid dispersions in water [3-5] were recently extended to monolayers spread at the air/water interface [6,7]. In such a system, molecular packing of the phospholipids can be easily controlled and changed thus inducing phase transitions by modifying the molecular area. Along this line, we have previously shown [6] that during the liquid-crystal to gel phase transition of dipalmitoylphosphatidylcholine the intensity of the fluorescence emitted by the probe DPE was definitely increased. This behaviour could be partly explained by the observation of an environmental modification but a reorientation of the probe could also have contributed. Herein is presented a theoretical background which is appropriate to evaluate reorientation factors from measurements of fluorescence excited with polarized incident light. Results of observations with DPE embedded in DPC monolayers will be reported and discussed with regard to data already inferred from experiments on the dynamic aspects of phospholipid assembly.

II- MATERIALS AND METHODS.

2.1. Chemicals

DPC was purchased from Sigma (USA). DPE was a generous gift from Dr Lussan (Bordeaux, France). All these compounds were pure as considered by thin layer chromatography and were used without further purification. Salts were analytical grade. Ultra pure water for semi-conductor industry (Motorola, Toulouse, France) was used throughout the experimentation. Solvents were spectroscopically pure.

2.2. Monolayer and fluorescence experimentation

The experimental procedure was described previously [6]. Modifications which concern the fluorescence apparatus were as follows. A Glan prism was used to polarize the incident light linearly. Rotation of the device around the light axis allowed the definition of two crossed positions. The intensity of light transmitted through the whole optical system was checked to be not dependent on the position of the prism. Wavelengths were selected by use of an

interference filter (MTO 3846 or Schott UV PIL) for excitation and a large band filter (Kodak 2E coupled with a MTO DH 525 C') for emission. With this set of filters a good signal to noise ratio (about 50) was achieved with the electronic time constant (2sec.) we have used. The fluorescence signal was recorded on a pen recorder. For each compression state of the film, the polarizing prism was tilted several times from one position to the other alternatively and the signal recorded in order to accommodate any drift or fluctuation. In all experiments temperature was $20.0 \pm 0.5°C$.

III- THEORY

3.1. Fluorescence.

Directional dependance of absorption of light by a molecule is described by the classical theory of oscillating dipoles.

The intensity of absorption for an individual transition moment is proportionnal to $\cos^2 \psi$ where ψ is the angle between the electric vector of the incident light and the transition moment. Introducing $N(\theta)$, a distribution function of the transition moments, we have for the whole system

$$I_A \propto \int_0^{2\pi} \int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2 \psi \; N(\theta) \sin\theta \, d\theta \, d\varphi$$

where θ is the polar angle with respect to an axis normal to the monolayer (symmetry axis). $N(\theta)$ is independent of the azimuthal angle φ because the orientation within the monolayer is random.

The reemission process being the same whatever the polarization state of the exciting beam, we get :

$$I_F \propto \int_0^{2\pi} \int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2 \psi \; N(\theta) \sin\theta \, d\theta \, d\varphi$$

It should be stressed that any effect of the polarization state of the incident light on the fluorescence emitted by a fluorescent labelled lipid monolayer will originate only in the absorption process.

With our device, the electric field of the incident beam can be either parallel to the plane of the monolayer or in a perpendicular plane (the so called incidence plane).

Using well defined distribution functions, it is then possible to calculated a relative value of the associated fluorescence intensity. The ratio of the intensities detected for both polarization states of the incident light is then obtained and allows

an evaluation of $N(\theta)$.

3.2. Selective transmission of the polarized light by a monolayer.

To a first approximation, a monolayer of lipid spread at the air/water interface may be considered as an homogeneous and isotropic film of refractive index n. For a non-absorbing film, the incident and transmitted light intensities I_0 and I are related by the transmission coefficients T [9] :

$$I_0 = T\ I$$

Using the Fresnel coefficients for polarized light with the electric vector respectively parallel and perpendicular to the plane of incidence, the associated transmission coefficients are given by :

$$T_{//} = 1 - \left(\frac{tg(i_1 - i_2)}{tg(i_1 + i_2)} \right)^2$$

$$T_{\perp} = 1 - \left(\frac{\sin(i_1 - i_2)}{\sin(i_1 + i_2)} \right)^2$$

i_1 being the angle of incidence, i_2 the angle of refraction

$$\sin i_2 = n \sin i_1$$

Using for n the value 1.425 [8] , we found

$$\frac{T_{//}}{T_{\perp}} = 1.07 = \frac{T_{YZ}}{T_X}$$

The ratio of the fluorescent intensities experimentally determined was corrected by this value in order to have the same illuminating conditions whatever the polarization state of the incident beam.

IV - RESULTS

Three distribution functions were considered :

1) - Probe molecules are distributed on a cone of half angle Θ .

2) - The distribution of Θ around its mean value Θ_m is rectangular.

3) - The distribution of Θ around its mean value Θ_m is gaussian.

With a reference axis system where the Z axis is normal to the monolayer plane, the ZY plane being the incidence plane, coordinates of the transition moment are (Fig. 1) :

$$\vec{M} \quad (\sin\theta\cos\varphi\ ,\ \sin\theta\sin\varphi\ ,\ \cos\theta\ )$$

The electric fields of the incident beam are :

$$\vec{E}_x \quad (1, 0, 0) \qquad\qquad \vec{E}_{yz} \quad (0, \frac{1}{\sqrt{2}}\ \frac{1}{\sqrt{2}})$$

$\vec{M}$ and $\vec{E}_i$ are expressed as unitary vectors so :

$$\cos\psi = \vec{M} \cdot \vec{E}_i$$

As mentioned above, a monolayer must be considered as a film of refractive index n, deviating the incident beam.Thereby using n=1.425 (8),for fluorescent probes lying at the polar head level of the phospholipid,the effective electric fields of the incident beam will be:

$$\vec{E}_x \quad (1,0,0) \qquad\qquad \vec{E}_{yz} \quad (0, \frac{1}{2}, \frac{\sqrt{3}}{2})$$

Under these conditions:

Model 1 gives :

$$J\left(\frac{X}{YZ}\right) = \frac{2\sin^2\theta}{0.5\sin^2\theta + 3\cos^2\theta}$$

where $J\left(\frac{X}{YZ}\right)$ is the ratio of the fluorescence intensity when the incident beam is polarized parallel to the X axis over the intensity when it is polarized in the YZ plane.From computed values,it is possible to find the θ value associated to the experimental observations.

Model 2 gives :

$$J\left(\frac{X}{YZ}\right) = \frac{4(\cos(\theta_m+\Delta) - 1/3\cos^3(\theta_m+\Delta) - \cos(\theta_m-\Delta) + 1/3\cos^3(\theta_m-\Delta))}{(\cos(\theta_m+\Delta) + 5/3\cos^3(\theta_m+\Delta) - \cos(\theta_m-\Delta) - 5/3\cos^3(\theta_m-\Delta))}$$

where θ_m is the mean value of θ and θ is homogeneously distributed between $\theta_m - \Delta$ and $\theta_m + \Delta$. It follows that an experimental value of $J\left(\frac{X}{YZ}\right)$ will give a curve in the (θ_m, Δ) space.

Model 3 gives :

$$J\left(\frac{X}{YZ}\right) = \frac{\int_{\theta_m - \frac{\pi}{2}}^{\theta_m + \frac{\pi}{2}} 2 \sin^3\theta \exp\left(-\left(\frac{\theta - \theta_m}{\Delta}\right)^2\right) d\theta}{\int_{\theta_m - \frac{\pi}{2}}^{\theta_m + \frac{\pi}{2}} \sin\theta \left(1/2 \sin^2\theta + 3\cos^2\theta\right) \exp\left(-\left(\frac{\theta - \theta_m}{\Delta}\right)^2\right) d\theta}$$

where θ_m is the mean value of θ and Δ is the variance associated to the Gaussian distribution. As for Model 2, a curve in the (θ_m, Δ) space will give the same value of $J\left(\frac{X}{YZ}\right)$

It is currently accepted that due to its chemical structure DPE is a molecule whose chromophoric group probes for the polar head region of phospholipids [10]. Under this assumption, corrections for the dioptre effect due to the film were used. As shown in Fig. 2, the $J\left(\frac{X}{YZ}\right)$ ratio decreases sharply at the end of the liquid-crystal to gel phase transition. During the transition, it appears rather constant as it is in the gel state.

Trivalent cations are known to form a complex with lecithins (11,12) which may induce a conformational change in the polar head.

Fitting these results with the postulated model distributions lead to the following conclusions:

-with Model 1,only subttle changes in θ (from 53° in the gel state to 56° during the transition) should occur,

-Model 2 is illustrated by the curve of fig.4 where any couple (θ,Δ) which fits the observed $J(X,YZ)$ is shown for both states (gel state and transition between liquid expanded and gel states).From this graph,it can be seen that values of Δ greater than 40° are associated to a large range of values of θ .But such a high value of Δ is indicative of a scattering of the orientation and orientation looses any signification.Furthermore a given molecule will have large changes in its orientation with time;such large movements of the probe are unprobable for the surface pressure we have used($\Delta\pi > 3 mN.m^{-1}$) For such states a monolayer should be considered as a rigid assembly. On the contrary well defined values of θ are associated to values of Δ smaller than 40°.Under such assumptions,the experiments showed an abrupt decrease in Δ at the end of the transition if it is assumed

that Δ is zero in the gel state (Fig.3).In all cases whatever the values of Δ in the gel state,the width of the distribution of orientation decreases at the end of the transition(Fig.4).

-The same behaviour was found with Model 3.

V - DISCUSSION

Using polarized light as incident beam allows us to explain the influence of orientations on the observed behaviour of the fluorescence emission of labelled monolayers during film compression [6]. In the case of DPE, we have reported previously that a change in the probe environment does occur. From the present study, it is further shown that rather than a large probe reorientation during the phase transition what occurs is most likely a spreading of the distribution of orientations.As explained when describing the data obtained with Model 2 (or Model 3),values of Δ larger than 40° are associated to an almost random distribution of θ. Such a condition is hardly conceivable if it is taken into account that for the surface pressure we have used a monolayer is a regular assembly where the orientations of its components are well defined parameters. If now Δ is presumed to stay constant but smaller than 40°, the phase transition should be linked only to subbtle changes in θ as obtained for Model 1 .Such a phenomena cannot be related to other physical observations(12).Indeed taking into account the change of fluidity observed with DPC at the end of the liquid expanded to gel states transition [7] and the observed change in rotation of the chromophoric group of DPE with microvesicles at the phase transition [5], the gel state can be considered as rather structured and rigid. Under such conditions, the assumption that the parameter Δ of the orientation distribution is 0 or very small in the gel state appears trustworthy. From Fig. 2 and 3, the distribution for the liquid expanded state, assuming θ_m keeps on the same value, has a larger Δ (25-30°), Δ being either the half width (homogenous distribution) or the variance (gaussian distribution). The difference between the two states lies

in a less defined orientation rather than in a change in orientation.

Trivalent ions such as La^{+++} are known to induce changes in the fluorescence polarization of DPE embedded in DPC microvesicles [11] and to give a modification in the orientation of the choline group [12]. Our results suggest that such effects do not influence the orientation of the chromophoric group of DPE. These ionic effects should only concern the outer part of the polar head of the phospholipid (choline group) but not the glycerol region which is probed by DPE [10].

Any kind of fluorescent species embedded in monolayers viz. phospholipids or proteins may be used in such an approach as described here and lend support for investigation of changes in local order and constraints in membrane models.

Acknowledgements: the author thanks Pr. A.Baudras and Dr. J.F. Tocanne for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1 - Kasai, M., Changeux, J.P. and Monnerie, L. (1969) Biochem. Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 420-427.

2 - Patrick, J., Valeur, B., Monnerie, L. and Changeux, J.P. (1971) J. Membr. Biol. 5, 102-119.

3 - Andrich, M.P. and Vanderkooi, J.M. (1976) Biochemistry 15, 1257-1261.

4 - Bashford, C.L., Morgan, C.G. and Radda, G.K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 157-172.

5 - Faucon, J.F., and Lussan, C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 307, 459-466.

6 - Teissié, J., Tocanne, J.F. and Baudras, A. (1976) FEBS Letters 70, 123-126.

7 - Teissié, J., Tocanne, J.F. and Baudras, A. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 77-85.

8 - Steinemann, A., Stark, G. and Läuger, P. (1972) J. Memb. Biol. 9, 177-194.

9 - Bruhat, G., "Optique", Ed. Masson, Paris, (1965) p. 384.

10 - Waggonner, A.S. and Stryer, L., (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 579-589.

11 - Lussan, C. and Faucon, J.F. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 345, 83-90.

12 - Brown, M.F. and Seelig, J. (1977) Nature, 269, 721-723.

ABBREVIATIONS

DPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPE	Dansylphosphatidylethanolamine

LEGENDS

Fig. 1 : Fluorescence measurements on monolayers : shematic drawing of the geometrical disposition.

Fig.2 : Ratio of observed fluorescence intensities for the perpendicular polarized states of the incident beam as function of the compression state of the DPC monolayer.

Excitation wavelength was 356 nm ($\Delta\lambda$ = 20 nm). The probe (DPE) to phospholipid (DPC) molar ratio was 1 to 100. Standard deviations observed with 4 determinations were 0.02.

Subphases were 0.1 M NaCl, pH 6 ▲ and 50mM $LaCl_3$, pH 6 ✱

Fig. 3 : Phase transition of DPC monolayers.

A - Surface pressure measurements with continuous compression. The same curve was obtained on both subphases.

B - Changes in the half-width of the rectangular distribution during stepwise compression of the DPE labelled DPC monolayers. θ was assumed to be 53°. Excitation wavelengths were 332 nm ($\Delta\lambda$ = 10 nm) ● , △ and 356 nm ($\Delta\lambda$ = 20 nm) ▲ , ✱ . Subphases were 0.1 M NaCl, pH 6 ▲ , ● and 50 mM $LaCl_3$, pH 6 △ , ✱ . Abscissa scale is area per molecule. The probe (DPE) to phospholipid (DPC) molar ratio was 1 to 100.

Fig. 4 : Plot of couples (θ ,Δ) fitting the observed ratio $\mathcal{J}(\frac{X}{YZ})$ and assuming a homogeneous distribution.

θ is the mean value of the polar angle and Δ the half width of the distribution. ● is associated to the gel state (π = 15 dyne/cm) and ■ to the liquid expanded state (π = 5 dyne/cm). Subphase was 0.1 M NaCl, pH 6 . Excitation wavelength was 356 nm ($\Delta\lambda$= 20 nm).

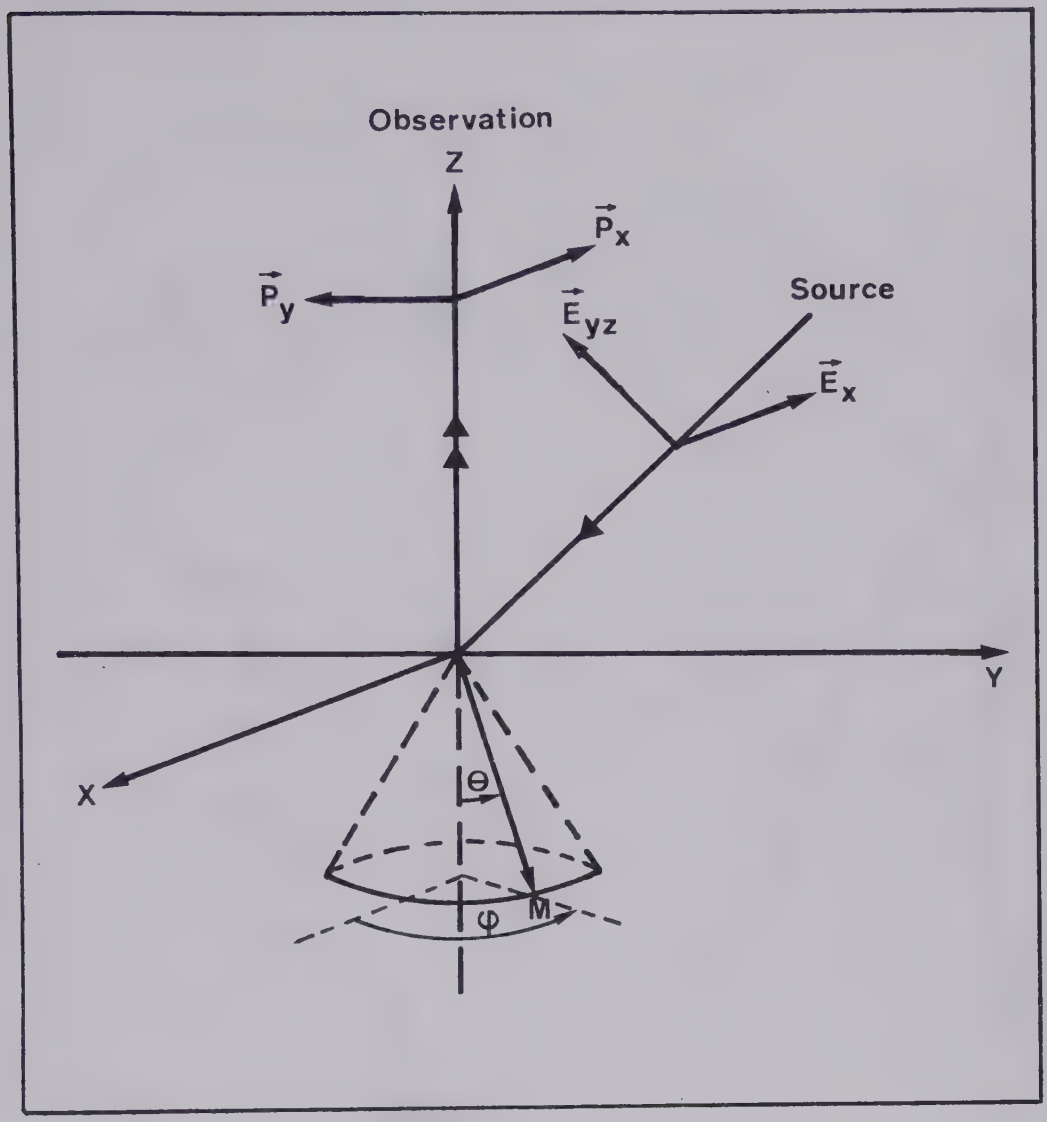


FIGURE 1

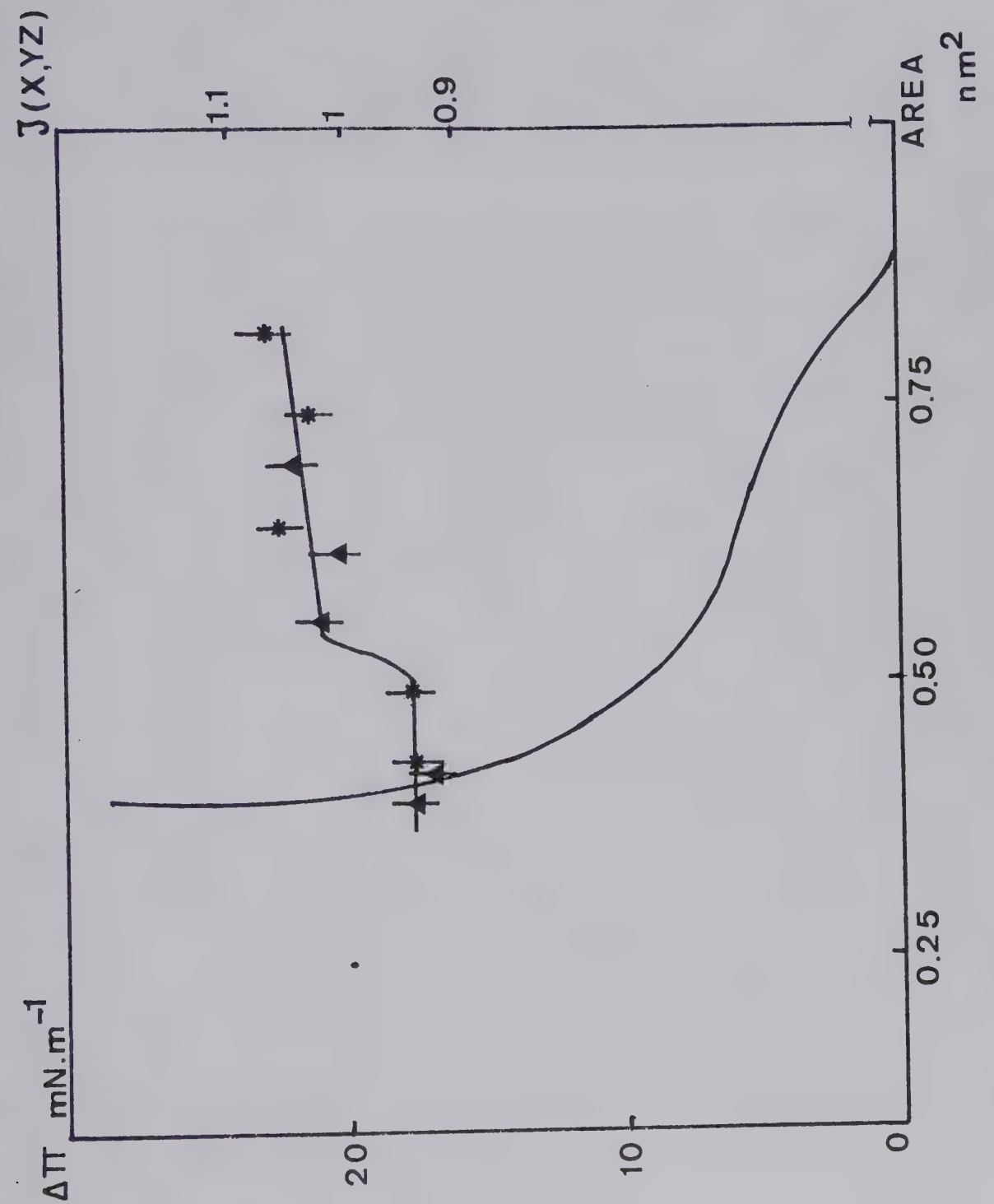


FIGURE 2

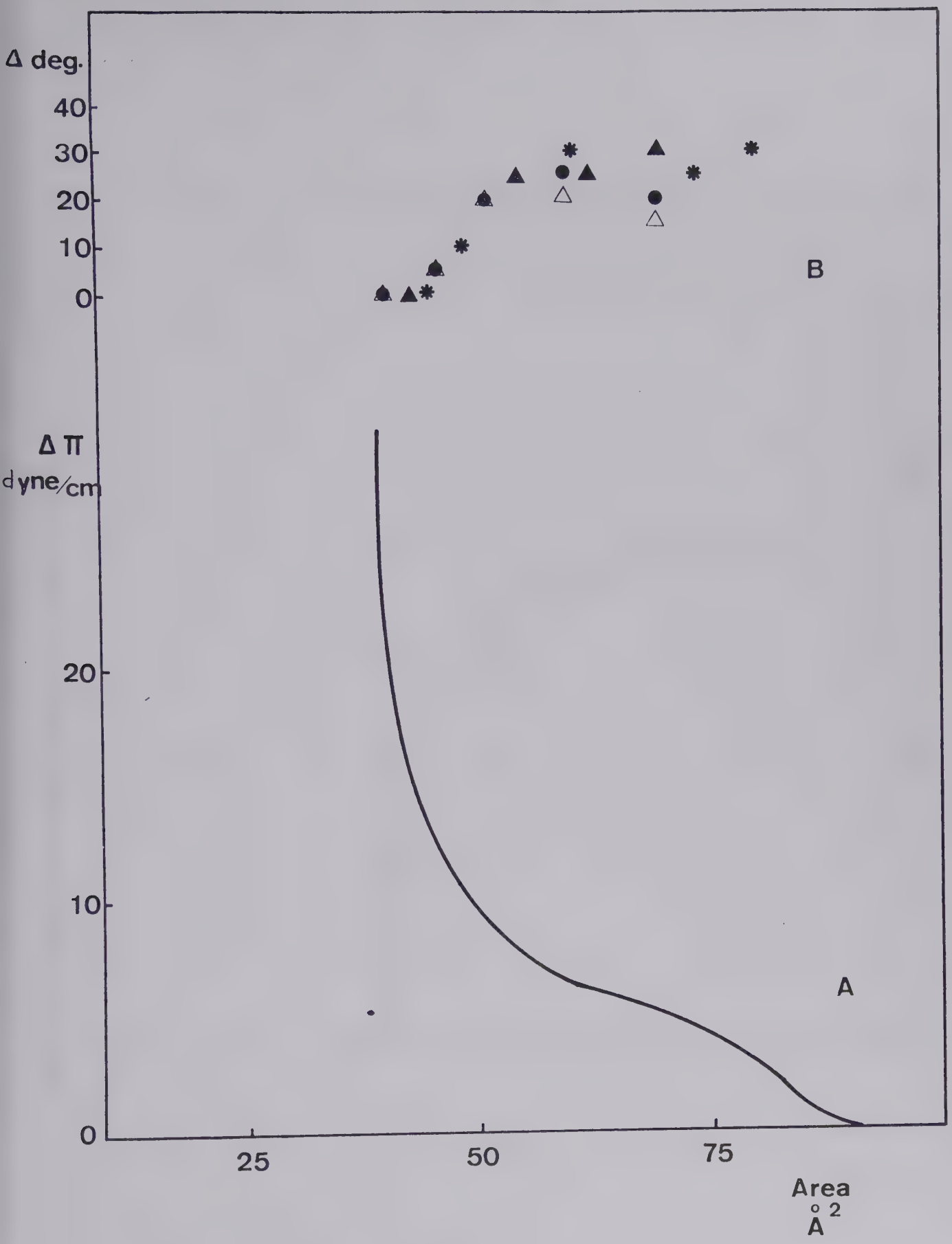


FIGURE 3

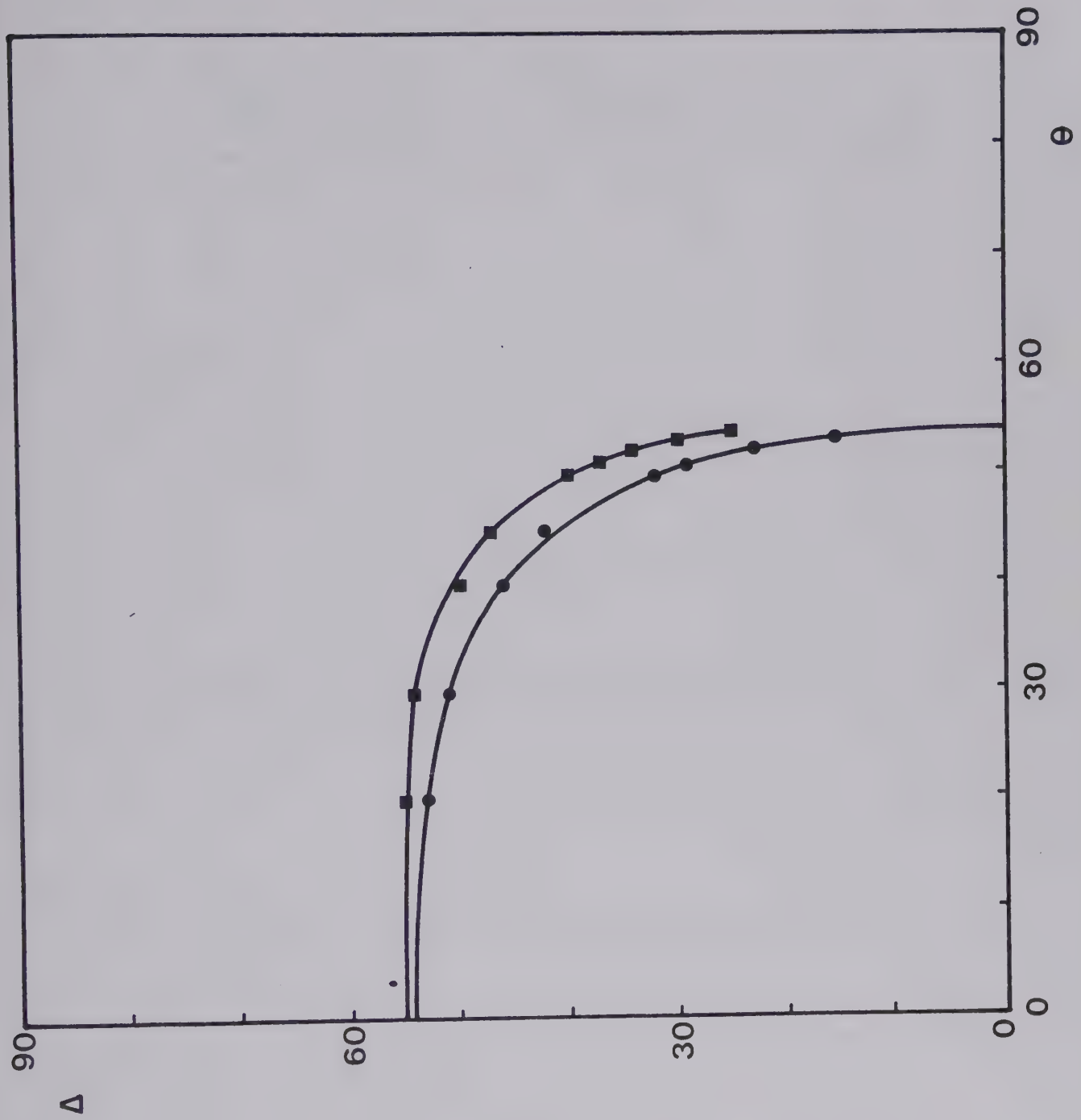


FIGURE 4

FLUORESCENCE STUDIES OF 1-8 ANILINONAPHTHALENE SULFONATE BINDING TO LECITHIN MONOLAYERS SPREAD AT THE AIR-WATER INTERFACE : EFFECTS OF THE COMPRESSION STATE OF THE FILM AND OF THE IONIC CONTENT OF THE SUBPHASE.

TEISSIE J.

Centre de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S.
F. 31077 TOULOUSE CEDEX

Accepté pour publication au Journal of Colloïd and Interface Science.

RESUME

Des mesures de fluorescence permettent la détermination des constantes de fixation du marqueur fluorescent amphiphile ANS à des monocouches de lécithine étalées à l'interface air/eau. Les travaux d'autres auteurs avaient montré que cet indicateur se fixe à l'interface membrane/eau et que ses caractéristiques d'émission sont sensibles à son environnement.

L'influence des paramètres : contenu en ions monovalents de la sous-phase et densité superficielle du film, a été systématiquement étudiée.

Pour des monocouches de lécithine de jaune d'oeuf, étalées sur une solution 0,1 M NaCl, la constante de dissociation (K_d) décroît si la pression de surface du film croît, la localisation spectrale de l'émission n'étant, par contre, pas affectée; il peut être conclu que l'environnement du marqueur n'est pas modifié. Aucune fixation n'a pu être déterminée sur des couches de dipalmitoylphosphatidylcholine à l'état gel.

Lorsque la force ionique de la sous-phase décroît, nous observons un accroissement de K_d et un déplacement bathochrome du spectre d'émission des marqueurs fixés à des films à l'état expansé. Sur l'eau pure, aucune fixation n'est détectée. Ces observations sont interprétées comme les conséquences d'un équilibre entre des forces de stabilisation d'origine hydrophobe et des forces de répulsion de nature électrostatique émanant de la tête polaire des lécithines.

Les conséquences de ces observations sur l'interprétation des phénomènes détectés au sein de membranes biologiques font l'objet d'une discussion.

SUMMARY:

The binding of an amphiphile fluorescent probe (ANS) to lecithin monolayers at the air/water interface was investigated by means of a fluorescence technique.It is already known that the probe,when bound, is lying at the membrane/water interface and that its fluorescence properties may be used as an indicator of its environment.

The influence of two parameters,the ionic content of the subphase and the packing density of the film,was investigated.

For egg yolk lecithin monolayers spread on 0.1 M NaCl,the binding dissociation constant (K_d) was shown to increase when the surface pressure increased,while the environment of the probe appeared unchanged as shown by its emission spectra.For dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers in the gel state,no binding was observed.

Decreasing the ionic strength in the subphase increased K_d and promoted a red shift of the emission of probes which are bound to films in the expanded state.No binding was detectable on pure water.These results appeared to be linked to a balance between hydrophobic stabilization forces and electrostatic repulsive forces originating from the polar head of lecithin.

Conclusions emerging from this work will be tentatively extended to biological membranes studies.

INTRODUCTION

Fluorescent probes have proved to be successful tools for membrane studies. Complex membrane systems like mitochondrial membranes (1) or the excitable electroplax of the eel (2) were investigated by using the environment sensitive probe ANS but an interpretation of the observed events in molecular terms is really difficult due to the complexity of such systems. Elementary events are best quantitized by using membrane models with a simplified physical arrangement like microvesicles or monolayers. In the latter case, the packing density of the phospholipids is readily controlled and changed by the experimenter. But it is only recently that this kind of model membranes was studied through fluorescence means (4).

In this paper, we will describe experiments related to the influence of the packing density and of the ionic strength of the subphase on the binding of the ANS probe to lecithin monolayers spread at the air/water interface.

Conclusions emerging from this work will be tentatively extended to biological membrane studies.

I - THEORETICAL CONSIDERATIONS

If the dipole moment of a dye is larger in the excited state than in the ground state, solvent-dependent emission spectra are to be observed, and the origin of this effect is explained by the theory of Lippert. In the ground state, solvent dipoles moments lie paralell to the probes'ones. If the dipole moments of the probe in the excited state are greater than in the ground state, solvent molecules will be reoriented through dipole dipole interactions during the life time of the excited state. These interactions will tend to lower the energy of the excited state. As a consequence, the energy of the fluorescence photon will be smaller resulting in a red-shift in the fluorescence emission. This effect will increase with the magnitude of the solvent dipole moment. So that polar solvents give larger red-shifts than the non polar ones. Another consequence of this relaxation process is the decrease in quantum yield of the fluorescence emission. The solvent reorientation increases the probability of radiationless desactivation. Conversely, processes which slow down these relaxation phenomena will give rise to blue-shift in the emission spectra and an increase in the quantum yield. Such effects are observed by changes in the viscosity of the solvent or with organized medium like membranes. On binding to biological membranes "Environment" probes give an increase in the observed fluorescence intensity and a blue shift of their emission.

.../

II - MATERIALS AND METHODS

II 1 - Chemicals

Dipalmitoyl phosphatidylcholine was obtained from Sigma. Egg lecithin was prepared following the procedure of Pangborn and was kindly supplied by Dr Laneelle of this Institute. Both compounds were checked for purity by thin layer chromatography. The magnesium salt of 1,8 anilinonaphtalene sulfonate (Kodak) was recrystallized from water after a filtration through activated charcoal. Salts were of analytical grade, ultra pure water for semi conductor industry (Motorola, Toulouse, France) was used throughout the experimentation.

II 2 - Monolayer and fluorescence experimentation

Stock solutions of phospholipid were prepared using an hexane-ethanol solvent mixture (9 = 1;v=v). The film pressure was raised stepwise, at constant area, by consecutive additions of the lipids using a cylindrical trough (Ø = 5 cm ; h = 2 cm). A known amount of a stock solution of the dye in ethanol (10^{-3}M) could be added in the subphase under the film and the concentration of the probe was made homogenous in the aqueous phase by stirring (Fig. 1).

Fluorescence measurements were obtained by use of an apparatus of our own design (4). The light emitted by an arc lamp (Osram XBO 75 W/Z) was focused on the air/water interface. The excitation wavelength was selected by use of an interference filter (MTO 3846). The illuminated spot had a radius of 2 mm. The relative angle between the excitation and the observation ligth beams is 45°, the axis of observation being perpendicular to the film surface. Emission wavelengths were selected by use of interference filters. The intensity was detected by use of a PM tube (EMI 9558). The signal was then recorded through a current tension converter and a pen recorder. The time constant of the electronic service was about 2 s. Signal to noise ratio was typically 50.

.../

In all experiments temperature was 20.0 ± 0,5°C. Surface pressures were determinated by a Wilhelmy plate balance. The observed signal has three components : the scattered light, the fluorescence of the probe in the aqueous phase and the fluorescence of the bound probe. The scattered light was checked to stay constant whatever the compression state of the monolayer. In the concentration range we have used, the fluorescence of the probe in the aqueous phase was proportional to its concentration.

The scattered light was first measured without any monolayer, then after addition of a known concentration of probe in the aqueous phase, the fluorescence signal could be detected ; the monolayer was subsequently spread at the air/water interface and the increase in fluorescence recorded.

III - ANALYSIS OF DATA

The dissociation constant of ANS in presence of phospholipid monolayers can be obtained through fluorescence measurements. The concentration of bound species is proportional to the increase in the recorded signal.

$$\Delta I_F = K\,(ANS)_{bound} \qquad (1)$$

This binding may be tentatively analyzed according to the following classical models : a)

a simple partition phenomena which is described according to :

$$ANS_{water} \overset{P}{\rightleftharpoons} ANS_{bound} \qquad (2)$$

where P is the partition coefficient or, b)

a binding reaction to preexisting sites S

$$ANS_{water} + S_{membranes} \overset{Kd}{\rightleftharpoons} Complexe \qquad (3)$$

.../

where K_d is the dissociation constant.

For case a), the amount of bound ANS will increase linearly with the concentration in the aqueous phase ; from (1), the fluorescence increase will have the same behaviour. Accordingly, the double reciprocal plot of fluorescence increase versus probe concentration in the aqueous phase will give a straight line emerging from the origin.

For case b), a saturation phenomena occurs when increasing the aqueous probe concentration. The above described double reciprocal plot will give a straight line, the intercept with the ordinates axis being the reciprocal of the fluorescence intensity increase when the monolayer is saturated with probe.

As :

$$K_d = \frac{[ANS_{water}]\,[S_{memb}]}{[Complexe]}$$

and $$[S_{total}] = [S_{memb}] + [Complexe]$$

from (1), it follows

$$K\,[S_{total}] = \Delta I_{F\ saturation}$$

$$K\,[Complexe] = \Delta I_F$$

$$K_d = \frac{[ANS_{water}]\,[\Delta I_{F\ sat} - \Delta I_F]}{\Delta I_F}$$

K_d is the aqueous probe concentration for which $\Delta I_F = \frac{\Delta I_{F\ saturation}}{2}$

* Quantities between brackets are concentrations.

IV Results

IV 1 - Influence of the packing density

When a monolayer of egg yolk lecithin is spread on an aqueous subphase (0,1 M NaCl, pH 6) containing 1 μM ANS a strong increase of the fluorescence intensity is observed (Table 1). If the mean molecular area of the phospholipid molécules is decreased by successive additions of phospholipid, the fluorescence signal remains unchanged until the surface pressure is increased to above 20 dyne/cm where the fluorescence starts to decrease (Table 1). This behaviour was also observed with a subphase containing 10 mM NaCl, pH 6 but not on 1 mM NaCl, pH 6 where the fluorescence remains constant but rather small.

When using dipalmitoylphosphatidylcholine as a phospholipid, a gel state can be obtained by compressing the film. On spreading such a monolayer (in the expanded state) on a subphase (0,1 M NaCl, pH 6) containing 1 μM ANS a strong increase of fluorescence was also observed (Table 2). But if now the film was compressed, the signal decreased sharply all along the liquid expanded to gel phases transition and eventually the fluorescence signal was no more detectable when the gel state was reached (Table 2). The same behaviour was observed on 10 mM NaCl, pH 6.

By increasing the concentration of the probe in the subphase for a given monolayer, a saturation phenomena was observed. As described above, this suggests that binding to preexisting sites occurs. With egg yolk lecithin monolayer, the dissociation constant was determined in the expanded and in the compressed states (Table 3), and it was observed to increase upon compression.

The fluorescence signal corresponding to saturation of the film with the probe was also determined in both cases and found to be higher with the densely packed film.

IV 2 Emission spectra of the bound probe

By use of a set of interference filters having a maximum transmission wavelengths range from 448 nm to 560 nm, and making the appropriate corrections, it is possible to evaluate the emission spectra of the bound probe. As compared to the emission of the probe in an aqueous environnement, the emission of ANS is blue shifted and centered around 480 nm when inserted in an expanded DPC monolayer spread on 0,1 M NaCl, pH 6, (the maximum emission wavelength is 540 nm when the probe is in water). The magnitude of this blue shift can be estimated by inspection of the ratio of the intensity of the emission observed with filters centered at 476 nm to the one centered at 520 nm, the larger the blue shift the higher this ratio.

When compressing an egg yolk lecithin monolayer spread on 0,1 M NaCl, this ratio is almost constant (Table 3).

IV 3 Effect of the ionic content of the subphase

As shown in Table 1 and 2, the fluorescence increase observed when a lecithin monolayer is spread on an aqueous subphase containing the probe ANS strongly depends on the ionic concentration of the subphase. Furthermore, if the film is spread on pure water (containing 1 μM ANS) , no fluorescence increase is detectable. This behaviour was observed whatever the packing density of the film and the nature of the phospholipid (either egg yolk lecithin or dipalmitoylphosphatidylcholine).

With lecithin films in the expanded state, comparative

studies of the binding reaction of the probe were conducted as a function of the ionic content of the subphase (Table 4). The dissociation constant was observed to remain unchanged for ionic concentration (NaCl) above 10 mM but to increase significantly at very low ionic strength (1mM NaCl).

The characteristic ratio used to evaluate the magnitude of the blue shift was shown to increase with increasing the ionic concentration. The limit value of the fluorescence signal associated to a film saturated with the probe was also observed to increase with the ionic strength.

V - DISCUSSION

Changes in the packing density of a lecithin monolayer appear to influence mostly the affinity of the probe for the film but not, or very few, the structure of the neighbourhood of the bound probe. This was deduced from the observation of the in crease in the dissociation constant observed when compressing the film while the emission spectra remained almost the same. The observed increase in the fluorescence intensity associated to a film saturated with the probe can be related to an increase in the density of binding sites . Since the observed surface area is constant whatever the compression state , the number of binding sites and as a consequence the number of bound probes under this saturating condition will increase. These binding sites are unaffected in nature by the compression state of the lecithin film as shown by the emission spectra whereas the binding reaction is simply hindered. For dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers for which a gel state can be obtained, no probe binding could be detected for films in this densely packed state.

The concentration of monovalent ions in the subphase modulates binding interactions both as concerns the affinity of the probe for the film and the environment of bound ANS.

On pure water no binding could be detected as a result of a maximum contribution of repulsive forces. When increasing the ionic content, this repulsive effect is expected to decrease with a correlated decrease in the dissociation constant and a larger blue shift in the emission spectra.Such a behavior was really observed as described above. Binding of ANS to phospholipid monolayers is thus controlled by two opposite phenomena. The hydrophobic group of the probe tends to promote an insertion in the lipid leaflet while the polar group suffers repuls ion through electrostatic forces originating in the polar head of the phospholipid. Lecithin is a zwitter ionic compound with a dipolar

.../

head and the bound dye molecules which are in the very neighbourhood of these dipoles are affected by their associated electric field. The magnitude of the electrostatic effect depends on the ionic content of the subphase which gives a shielding effect. It follows that when the electrostatic repulsion was minimized, the probe could be buried deeper in the lipid layer where the relaxation phenomena of the solvent molecules is hindered. This phenomena will result in the observed blue shift and explain its relative increase at moderate ionic strength.

The increase in dissociation constant observed when the salt concentration is 1mM could find a simple explanation through the classical diffuse double layer potential theory (5) ANS, being an anion, introduces charges at the surface of the monolayer when bound - These charges produce a negative electrostatic potential which is larger at low ionic strength for a given number of bound ANS molecules. From the theory of the diffuse double electrical layer this should give a decrease of the dissociation constant when increasing the ionic content of the subphase as reported. But such a theory cannot explain the associated blue shift of the emission spectrum. The observed effect can only partly be due to this phenomena.

Explanation of such a phenomena through ionization processes merely linked to the local pH values at the polar head level seems doubtful. Other authors have shown that the ionized groups of acidic phospholipids can display large pK shifts when the ionic content of the subphase is changed (5). Since the pK of the amino group of ANS is of the order of 0.0 to 0.5 and only the anion is fluorescent, the observation of an absence of fluorescence increase on pure water should need a shift of about 6pH values.But so large a shift is unprobable and furthermore does not explain the observed shift of the emission spectra.

Binding of ANS to lecithin monolayers is clearly modulable by the two following parameters : packing density of the film and ionic concentration in the aqueous subphase.

It may now be questioned whether such modulations originating in changes of packing or local ionic concentration have participated in observations reported on complex biological membranes when investigated by use of ANS fluorescence. The action potential elicited in excitable membranes is directly linked to ion fluxes which are expected to result in relatively large local ion concentrations changes. Since ANS is known to label preferentially phospholipids in nerves, the observed increase in the emission of the dye during the action potential (2) can partly be the consequence of this ion induced modification of the environment of the probe. Correlated with the action potential, an increase of ANS fluorescence was observed which is blue-shifted as compared to the spectrum of fluorescence at rest. Upon energization of the mitochondria a decrease of ANS fluorescence was reported (1) but no clear-cut explanation was given as yet as concerns the origin of the effect. From our monolayer studies, we would suggest that changes of the packing of the lipid matrix should be investigated. Drugs have also been reported to produce changes of ANS fluorescence associated with membranes (6) and, here again, changes of packing density of the phospholipids is conceivable and have indeed been supported by experimentation with monolayers (7).

Acknowledgments: Thanks are due to Pr.Baudras for his help in preparing the manuscript and to Dr.Tocanne for his help in surface pressure measurments.

REFERENCES

1 - Chance B - (1970) - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 = 560

2 - Patrick J., Valeur B., Monnerie L. and Changeux J.P. (1971) J. Membr. Biol. 5, 102-119.

3 - Flanagan M.T. and Hesketh T.R. (1973), Biochim. Biophys. Acta, 298, 535-545.

4 - Teissié J., Tocanne J.F. and Baudras A. (1976), FEBS Lett. 70, 123-126.

5 - Mc Laughlin S. and Harary H. (1976) Biochemistry 15, 1941-1948.

5 - Sacre M.M. and Tocanne J.F. (1977) Chem. Phys. Lipids 18, 334-354.

6 - Feinstein M.B., Spero L. and Felsenfield H. (1970), FEBS Lett. 6 : 245-248.

7 - Ueda I., Tashiro C. and Arakawa K. (1977), Anesthesiology 46 : 327-332.

TABLE 1 : FLUORESCENCE CHANGES OF BOUND ANS INDUCED BY COMPRESSION OF A MONOLAYER OF EGG YOLK LECITHIN.

The fluorescence background due to the aqueous subphase was subtracted : its intensity was 1 (fluorescence intensities were expressed in arbitrary units).

Experimental conditions were the following : excitation wavelength was 356 nm ($\Delta\lambda$= 20 nm), observation wavelength was 476 nm ($\Delta\lambda$ = 10 nm). The concentration of ANS in the aqueous phase was 1 μM. Compression was obtained by successive additions of phospholipids to the film formed in a trough with constant area.

TABLE 2 : FLUORESCENCE CHANGES OF BOUND ANS INDUCED BY COMPRESSION OF A MONOLAYER OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE.

Conditions were the same as in Table 1, except that ANS concentration was 1.2 μM.

TABLE 3 : BINDING PARAMETERS OF ANS TO A MONOLAYER OF EGG YOLK LECITHIN : THE INFLUENCE OF THE COMPRESSION STATE OF THE FILM.

The monolayer was spread on 0.1 M NaCl.

I_∞ is the extrapolated value obtained from a double reciprocal plot of fluorescence intensity versus aqueous probe concentration for infinite ANS concentration.

The spectral ratio is the ratio of the observed intensities at wavelengths 476 nm and 519 nm.

Excitation wavelength was 356 nm ($\Delta\lambda$ = 20 nm).

Dissociation constants and I_∞ were computed from measurements at 476 nm (observation wavelength).

TABLE 4 : BINDING PARAMETERS OF ANS TO A MONOLAYER OF EGG YOLK LECITHIN : THE INFLUENCE OF THE NaCl CONCENTRATION IN THE SUBPHASE.

Surface pressure of the film was 1.8 dyn/cm.
Other conditions were as described in Table 3.

Subphase ionic content NaCl (mM)	Surface pressure (dyn/cm)					
	0.3	1.8	9.8	20.6	33.8	43
1	0.7	0.7 ± 0.15	0.7	0.5	0.8	0.5
10	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.5	1.07	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.6	1.5 ± 0.6
100	3.7	3.7 ± 0.7	4.2 ± 0.5	3.7 ± 0.5	2.3 ± 0.6	1.9 ± 0.5

- TABLE 1 -

	Molecular area ($Å^2$)								
	107	94	83	75	68	62	57.5	53.5	50
Subphase ionic content NaCl (mM)									
10		4	3.1	2	1.4	0.75	0.37	0	0
100	8.3 $\pm$ 1	5.3 $\pm$ 1	3.5 $\pm$ 1	1.5 $\pm$ 1	0.76	0.6	0.2	0.1	0

- TABLE 2 -

Surface pressure (dyn/cm)	Dissociation constant (μM)	I_∞ (arbitrary units)	Spectral ratio
1.5	0.68 ± 0.02	4.9 ± 0.5	1.1
43	1.75 ± 0.5	6.2 ± 2	1.15 ± 0.1

- TABLE 3 -

NaCl in subphase (mM)	Dissociation constant (μM)	I_∞ (arbitrary units)	Spectral ratio
1	1.1	3.5	0.73 ± 0.1
10	0.66	4.3 ± 0.2	0.92 ± 0.05
100	0.68	4.9 ± 0.5	1.1

- TABLE 4 -

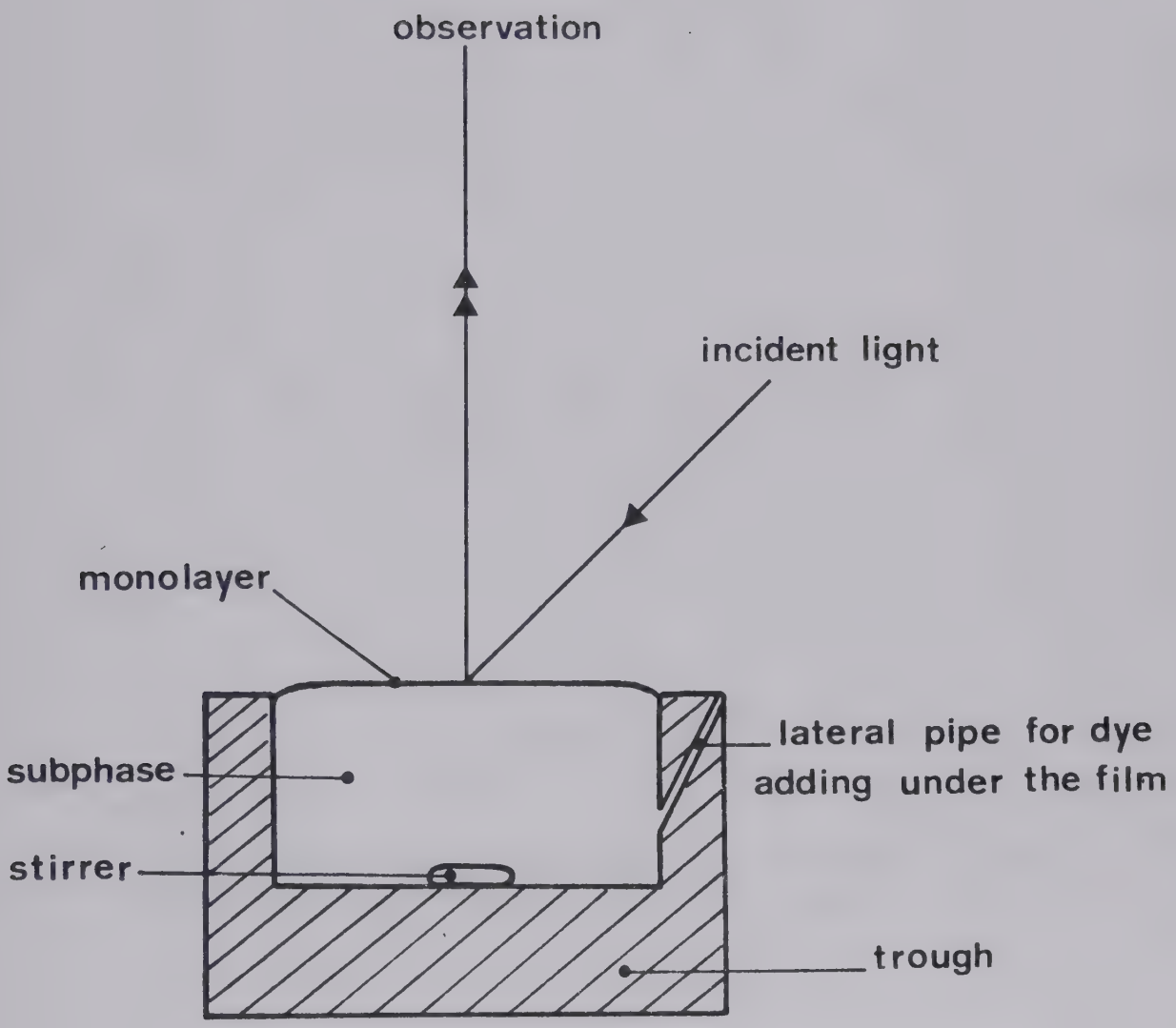

observation
incident light
monolayer
lateral pipe for dye
adding under the film
subphase
stirrer
trough

Fig 1

THE USE OF ANS AS A PROBE OF MOLECULAR PACKING IN DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE ASSEMBLIES

TEISSIE Justin

Centre de Recherches de Biochimie et Génétique Cellulaires du C.N.R.S.
118, route de Narbonne - 31077 TOULOUSE CEDEX - FRANCE.

RESUME

Les paramètres de fixation de l'ANS à des assemblages de phospholipides servent d'indicateurs de leur état d'organisation. Dans le cas de DPC à l'état gel, le comportement des microvésicules met en évidence le caractère expansé des constituants du feuillet externe. Les microvésicules apparaissent comme un assemblage dissymétrique le feuillet interne étant beaucoup plus compact. Les conséquences de cette propriété lors de l'utilisation de microvésicules dans la modélisation de membranes biologiques sont présentées.

Molecular packing of the constituents of the membrane is considered critical for various processes occuring at the membraneous level as observed for some enzymatic activities (1) or in the action of anasthetics (2). In this respect, monolayers are a very convenient model of biological membranes for this parameter can be easily monitored by controlled surface pressure. The definition of the molecular packing for other models (microvesicles, BLM) cannot be obtained by direct measurements but only by comparison with similar experiments performed on monolayers (3). Binding of the amphiphilic compound 1-8 Anilinonaphthalenesulphonate (ANS) to model membranes was reported to be a sensitive indicator of the structure of the lipid assembly (4 - 7). X-rays studies of ANS binding to multilayered systems of lecithins have shown that this probe, when bound, is located at the lipid-water interface (8). An increase in quantum yield and a blue shift in the emission spectra were observed in fluorescence studies of the interaction of ANS with various model membranes (9 - 17). Its binding is mainly due to hydrophobic forces but is determined by electrostatic interactions arising mainly from the double layer potential which appears in proportion to the negatively charged probe which is absorbed at the interface (10, 16 - 18). Furthermore, monolayer studies have shown that the packing density of the film modulates the affinity of the probe for the film (10) when the ionic strength of the subphase is kept high. ANS can thus be used as a probe for the molecular packing of the phospholipid assembly.

In this study, the binding parameters of ANS to dipalmitoylphosphatidylcholine (DPC) model membranes (microvesicles, liposomes) were systematically investigated. DPC was choosen for two reasons : 1) lecithin is the main constituent in many biological membranes, 2) since DPC has a well defined chemical structure, comparatives studies can be made with results obtained in different laboratories.

Using results found in the litterature (9, 10, 12, 19, 20) a comparative study was achieved between the different models. Conclusions emerging from this comparison are given mainly concerning the packing density of the outer layer of microvesicles. Difficulties due to this effect when one uses microvesicles to mimic biological membranes will be discussed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

DPC was obtained from Sigma and was used without further purification after it was checked for purity by TLC. The magnesium salt of ANS (Kodak) was recrystallized from water after filtration through activated charcoal. NaCl (Normapur grade from Prolabo) was dissolved in quartz double distilled deionized water and the solution was filtered through Millipore filters (0.22 μM pore size) to remove any particles. Solutions were always deoxygenated by bubbling nitrogen. The pH of the saline solution was 5.5.

Microvesicles

Microvesicles were prepared either by sonication or by injection. The method of Seufert (21) was followed in the first case with a slight modification which consisted in using bath sonication instead of probe sonication : the bath sonicator (Ultrasons 75 T 801) was operated for more than 2 hours. The temperature of the bath was kept above the phase transition temperature of DPC (41°). Stock solutions of microvesicles were used in the 24 hours following preparation.

The injection method was used as described by Batzri and Korn (22). An ethanol solution of DPC was rapidly injected into a well stirred 0.1 M NaCl solution at 50°C. In order to lower the ethanol content of the suspension, it was dialyzed overnight.

In either case, residual multilamellar liposomes were centrifuged out in a Spinco L 50 operated 10 mn at 100 000 x g at 4°C.

Liposomes

Phospholipids were dispersed in the saline solution containing a known concentration of probe. The homogenization of the mixture was achieved at a temperature above the phase transition temperature and lasted more than one hour in order to ensure an homogeneous distribution of the probe within the phospholipid layers. Inner filter effects were calibrated by use of a reference solution of ANS in ethanol.

Fluorescence

Fluorescence measurements were made with the FICA model 55 spectrophotofluorimeter (corrected) working at a resolution of 7.5 nm and coupled with a chart recorder; the temperature of the cell was kept constant within 0.1°C.

RESULTS

1) Binding of ANS to microvesicles of DPC

As already reported from experiments at 20°C, it was observed that on mixing a suspension of sonicated DPC microvesicles with an aqueous solution of ANS a sharp and instantaneous increase of the fluorescence signal occurs (9, 11, 16, 17, 19). Both scattered light and emission of bound ANS can theoretically participate in this signal but under our experimental conditions (vesicle concentration less than 300 μM in phospholipid, ANS concentration less than 10 μM), the first effect was negligible. Fluorescence was observed to increase when the ANS concentration was increased stepwise for a given amount of vesicles. In order to avoid any influence of the electrical double layer in the binding processes as described earlier (18, 23), the salt concentration was kept high in all experiments (0.1 M NaCl). For a given lipid concentration, double reciprocal plots of fluorescence intensity versus probe concentration were linear and did not extrapolate to the origin. This observation is consistent with earlier results (9, 10) from which it was inferred that the probe interaction occurs in the form of the binding to preexisting sites with an increase in fluorescence quantum yield. The dissociation constant of this reaction and the size of the binding sites can be obtained from the double reciprocal plots of fluorescence intensity versus probe concentration, the lipid concentration being constant. Both plots were found linear. The parameters of this binding reaction are given in Table I. One binding site for a probe molecule corresponds to an assembly of 200 DPC molecules on the mean whatever the microvesicle preparation (injection or sonication).

By contrast with observations at 20°C, for which the fluorescence signal was stable with time under our experimental conditions, at temperature above the phase transition temperature (41°C) (19), the enhancement of fluorescence was clearly biphasic. The process showed a fast phase and a slower one with an amplitude of about 30 % of the former. The time constant of the fluorimeter (8s) did not allow a clear separation of the kinetics. Such behaviour has already been described

and related to the transport of ANS through the bilayer and to its binding on the inner layer (11, 19).

In the temperature range from 10°C to 30°C, i.e. below the phase transition temperature, it was possible to determine the binding parameters and no significant spectral shift was detected (λ^{max}_{exc} = 377 nm, λ^{max}_{em} = 485 nm). The maximal intensity of emission decreased with increasing temperature. As shown in figure 1, K_d only slightly increases with increasing temperature. A discontinuity in the Arrhenius plot of the dissociation constant is detected for temperature above 25°C. For the temperature range between 10°C and 25°C, ΔH° was + 2.4 Kcal - mol^{-1} and ΔS° - 18 cal. mol^{-1} K^{-1}. The results are the same for both microvesicle preparations, as shown in figure 1.

For temperatures above the phase transition temperature, binding sites located on both sides of the bilayer are accessible to the probe. As explained above, instrumental limitations made it impossible to accuratly determine the binding parameters for each side. Rather, a mean value of the dissociation constant was obtained. The emission spectra showed a small but significant red-shift as compared to those observed near 20°C (Table I). Here again, no difference was noted between microvesicles prepared by injection and by sonication.

2) Binding of ANS to liposomes of DPC

When ANS was added to an unsonicated dispersion at 20°, only a small increase of fluorescence was observed. By contrast, if the sample was first heated to 50° in the presence of the probe and then cooled back to 20°, a large fluorescence increment occured. Specific problems are encountered when working with liposomes. In particular, large signals due to light scattering need to be calibrated for substraction from the apparent emitted light. Moreover, high concentration of ANS need to be used in order to saturate the binding sites and under such conditions inner filter effects are high and must be corrected for (24). With due attention to the already mentionned problems, the fluorescence emission spectrum of ANS bound to phospholipids was observed to mimic that of ANS in ethanol. Emission maxima occured at 478 nm with a maximum for excitation around 377 nm. The apparent dissociation constant Kd was almost independent of the temperature in the range from 15°C to 25°C with a value of 50 μM resulting in a binding entropy of about - 20 cal $mol^{-1}K^{-1}$. The density of binding sites was calculated to be about 1 for every 15 phospholipid molecules.

DISCUSSION

Binding of ANS to microvesicles of pure DPC is consistent with a simple model of interaction in preexisting sites with an equilibrium constant being practically the same whatever the method used for their preparation. In the temperature range below the transition temperature, only binding sites located on the outer layer of the microvesicles are accessible (11, 19). ANS being bound at the polar head level, our observations confirms that both injection and sonication methods give identical particles with respect to the structure of the polar heads of the outer layer in this temperature range. As no shift in the emission spectra was observed whatever the probe concentration , we have used the binding sites can be considered homogeneous.

For microvesicles as well as liposomes, the Vant'Hoff enthalpy of binding (between 10 and 25°) is small (about 1 Kcal) and the ΔS_0° is quite large: of the order of - 20 u.e. These values are very similar to those obtained for the binding of the analogous probe N-phenylNaphthylamine to egg lecithin microvesicles (25) and rather typical of hydrophobic interactions. This behaviour can be explained by the "hydrophobic effect" as defined by Tanford (26) in the solvatation of ANS molecules when they leave the hydrophobic lipid matrix.

The high value of K_d for binding to microvesicles which is observed around 30°C remains unexplained. The "pre-transition" of DPC when determined by differential scanning calorimetry is known to occur at a somewhat higher temperature (34°C) but it extends over a broad range. Structural changes occuring at the level of the polar head during this "pre-transition" could explain this increased affinity. Other studies of ANS binding to PC model membranes (9) have shown that during the phase transition the weakening of the interaction between the polar head groups precedes the physical change of the hydrophobic part of the phospholipid.

In Table II, dissociation constants for the binding of ANS to different kinds of DPC assembly in the "gel state" are collected. This comparative study shows that microvesicles present a very high affinity for the probe as compared with other systems. In monolayer experimentation (10), the affinity of ANS for DPC was shown to be dependent on the packing density of the film.

Based on fluorescence experimentation (3), the molecular area per phospholipid on the outer layer of DPC microvesicles in the gel state was determined to be around 0.65 nm^2. By comparison, for DPC in the gel state, a value of 0.48 nm^2 was found for multilayers (27) and a value of 0.45 nm^2 for BLM (3).

The comparatively low dissociation constant we have found for microvesicles is in keeping with the relationship observed between ANS dissociation constant and the packing density of the phospholipid in monolayers. ANS binding to DPC membranes being molecular-packing sensitive, the dissociation constant reflects the tightness of the assembly. The high affinity of ANS for the outer layer of DPC microvesicles is thus indicative of a large molecular area for the phospholipid in agreement with other observations (3).

Concerning the inner layer, this conclusion of a loose packing is no more valid. In accordance with others (11, 19), we have observed that for microvesicles in the "gel state", no binding on the inner layer was detected when ANS was added to the surrounding medium. Furthermore, recent studies showed that for microvesicles of lecithin at temperatures above the phase transition temperature an asymetrical distribution of lipids between the two layers does exist (28, 29).

ANS transport through lecithin bilayers is controlled by the physical state of the phospholipid (30). Since no permeation is observed in the gel state and the outer layer is too loose to be a barrier to the transport of ANS, the inner layer of DPC microvesicles needs to be tightly packed.

In conclusion, liposomes and BLM appeared to be more tightly packed than the outer layer of the microvesicles. Microvesicles have been widely used as membrane models for permeation experimentation particularly. Nevertheless, these are quite sophisticated lipid assemblies with structural asymetry and different molecular packing for the two layers. This should be kept in mind when working with microvesicles. For example, in fluorescence experimentation, when working with microvesicles labelled on both sides, two kinds of probe environment are expected to exist. The fluorescence polarization which is then measured may be an average value between the two populations of bound probes. Probably, in fluorescence lifetimes experiments, the occurence of two kinds of binding sites may explain the rather complicated observation of a continuity in correlation times obtained when binding toluidinonaphthalenesulphonate (TNS) to egg lecithin microvesicles (31).

It is known that the electrical surface potential of a monolayer is dependent on the packing density of the film (32, 33). As a consequence of an asymmetrical distribution of phospholipids on the two monolayers of the microvesicles, an electrical transmembrane potential should be created, due to the individual potential of inner and outer monolayers being not identical. In this respect, the existence of a pH grandient across egg lecithin vesicles has been reported (34) and this result may be considered relevant to the asymmetry.

TABLE I : Binding parameters for ANS to DPC microvesicles and liposomes

a) Microvesicles

Temperature	$\lambda^{max}_{excitation}$ (nm)	$\lambda^{max}_{emission}$ (nm)	K_d (μM)
20°C ± 0.1	376 ± 5	485 ± 5	9.7 ± 1
51°C ± 0.1	376 ± 5	488 ± 5	> 15

b) Liposomes

20°C ± 0.1	376 ± 5	478 ± 2	50 ± 10
50°C ± 0.1	376 ± 5	484 ± 6	100 ± 10

TABLE II : Dissociation constants for the binding of ANS to DPC assemblies in the "gel state"

Type of assembly	K_d (μM)	Reference
monolayer	no binding observed (a)	(10)
microvesicles	9.7 $\pm$ 1 (a)	(this paper)
	10.8 (a)	(20)
liposomes	50 (a)	(this paper)
	50 (b)	(19)
spherical monolayer	1000 (a, c)	(9)
BLM	10 - 40 (a, d)	(12)

(a) Constants were obtained by fluorescence measurements and refer to 20°C

(b) constants were obtained by equilibrium dialysis at 20°C

(c) temperature was 15°C

(d) large inaccuracies affect the determination of K_d

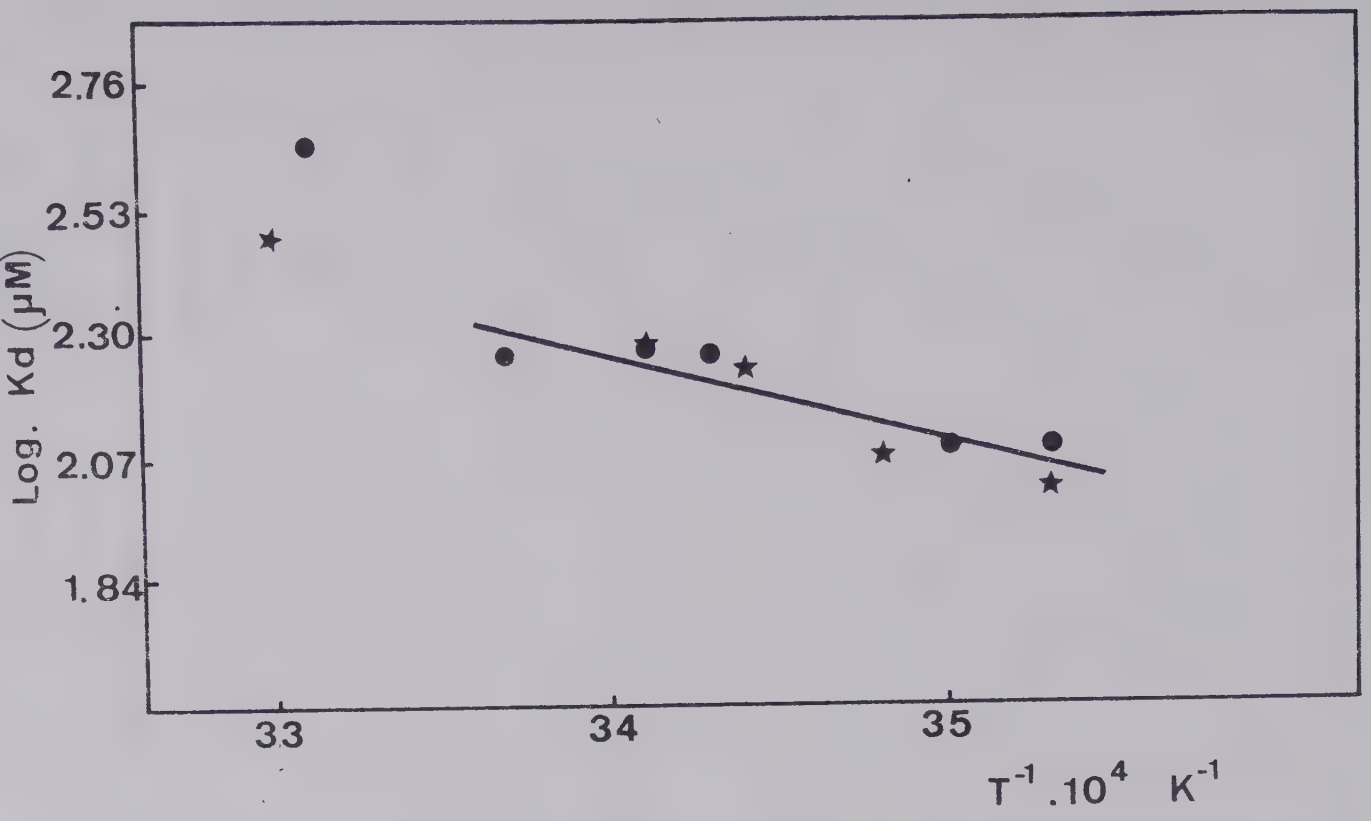


Figure 1 :

Van't Hoff plot of the dissociation constant for ANS binding to DPC microvesicles.

Constants were obtained from fluorescence measurements with phospholipid concentrations varying in the range from 50 μM to 300 μM. The solution was 0.1 M NaCl, pH 5.5. Microvesicles were obtained either by sonication (★) or by injection (●).

REFERENCES

1 - J.K. RAISON, J.M. LYONS, R.J. MELHORN and A.D. KEITH
J. Biol. Cell. (1971), 246, 4036-4040

2 - I.UEDA, C. TASHIRO and K. ARAKAWA
Anesthesiology (1977), 46, 327-332

3 - J. TEISSIE, J.F. TOCANNE and G.W. POHL
Ber. Bunsen Ges. (1978), 82, 875-876

4 - M. KASAI, J.P. CHANGEUX and L. MONNERIE
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969), 36, 420-427

5 - J. PATRICK, B. VALEUR, L. MONNERIE and J.P. CHANGEUX
J. Memb. Biol. (1971), 5, 102-119

6 - A. AZZI, B. CHANCE, G.K. RADDA and C.P. LEE
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1969), 62, 612-619

7 - C. GITLER, B. RUBALCAVA and A. CASWELL
Biochim. Biophys. Acta (1969), 193, 479-481

8 - W. LESSLAUER, J.E. CAIN and J.K. BLASIE
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1972), 69, 1499-1503

9 - D.H. HAYNES and H. STARK
J. Memb. Biol. (1974), 17, 313-340

10 - J. TEISSIE
J. Coll. Interf. Science, in press

11 - T. Y. TSONG
Biochemistry (1975), 14, 5409-5414

12 - W.G. POHL and J.TEISSIE
Z. Naturforsch. (1975), 30c, 147-151

13 - T. GULIK-KRZYWICKI, E. SHECHTER, M. IWATSUBO, J.L. RANCK and V. LUZZATI
Biochim. Biophys. Acta (1970), 219, 1-10

14 - H.P. ZINGSHEIM and D.A. HAYDON
Biochim. Biophys. Acta (1973), 298, 755-768

15 - W. HASSELBACH and K.W. HEIMBERG
J. Memb. Biol. (1970), 2, 341-350

16 - M.T. FLANAGAN and T.R. HESKETH
Biochim. Biophys. Acta (1973), 298, 535-545

17 - E.P. BAKKER and K. VAN DAM
Biochim. Biophys. Acta (1974), 339, 157-163

18 - S. MAC LAUGHLIN and H. HARARY
Biochemistry (1976), 15, 1941-1948

19 - K. JACOBSON and D. PAPAHADJOPOULOS
Biophys. J. (1976), 16, 549-560

20 - K. JACOBSON and D. PAPAHADJOPOULOS
Biophys. J. (1975), 15, 16a

21 - W.D. SEUFERT
Biophysik (1970), 7, 60-73

22 - S.BATZRI and E.D. KORN
Biochim. Biophys. Acta (1973), 298, 1015-1019

23 - D.H. HAYNES
J. Memb. Biol. (1974), 17, 341-366

24 - H. TRAUBLE and P. OVERATH
Biochim. Biophys. Acta (1973), 307, 491-512

25 - P. TING and A.K. SOLOMON
Biochim. Biophys. Acta (1975), 406, 447-451

26 - C. TANDFORD
"The hydrophobic effect" (1973), Chapter 4, Wiley Ed.

27 - D. CHAPMAN, R. M. WILLIAMS, and B.D. LADBROOKE
Chem. Phys. Lipids (1967), 1, 445-475

28 - A. CHRZESZCZYK, A. WISHNIA and C.S. SPRINGER
Biochim. Biophys. Acta (1977), 470, 161-169

29 - C. HUANG and J.T. MASON
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1978), 75, 308-310

30 - T.Y. TSONG, M. GREENBERG and M.I. KANEHISA
Biochemistry (1977), 16, 3115-3121

31 - J.H. EASTER, R.P. DETOMA and L. BRAND
Biochim. Biophys. Acta (1978), 508, 27-38

32 - D.O. SHAH and J.H. SCHULMAN
J. Lipid Res. (1965), 6, 341-349

33 - M. EL MASHAK
Personnal communication

34 - Y. PRIGENT, TRAN-DINH-SON and C.M. GARY-BOBO
6th International Biophysics Congress - Kyoto (1978)

FLUORESCENCE TEMPERATURE JUMP RELAXATIONS OF DANSYLPHOSPHATIDYLETHANOLAMINE IN AQUEOUS DISPERSIONS OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE DURING THE GEL TO LIQUID-CRYSTAL TRANSITION.

TEISSIE Justin

Centre de Biochimie et Génétique Cellulaires
du C.N.R.S.

118, route de Narbonne 31077 TOULOUSE - FRANCE -

RESUME

Le changement de l'émission de fluorescence de la sonde dansylphosphatidyléthanolamine dispersée au sein de multicouches de DPC est un indicateur de la transition entre les phases gel et liquide expansé. La cinétique de cette transition induite par la technique du saut de température peut être détectée par l'évolution du signal émis par la sonde. Les résultats obtenus par ces mesures sont discutés en comparaison avec ceux obtenus par mesure de turbidité.

SUMMARY

The change of fluorescence of the probe dansylphosphatidylethanolamine embedded in multilamellar liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine was used to investigate the dynamics of the thermotropic gel to liquid crystalline phase transition by use of the temperature-jump technique. The results are discussed and compared to published observations on the same system in which the phenomenon was monitored by turbidity changes.

The thermotropic phase transitions of phospholipid assemblies - multilamellar liposomes and closed monobilayered microvesicles - have been investigated by use of various techniques including ESR, NMR, fluorescence spectroscopy, ultrasonic absorption, light scattering and calorimetry (1-5). By contrast with the large amounts of data collected on the equilibrium properties of these transitions few observations have concerned their dynamic behaviour (6). Several distinct classes of structural changes are expected to take place when the so-called pretransition and melting processes are triggered which we hope could be revealed by fast kinetic investigation using different monitoring signals. Here we report observations by temperature-jump experimentation in the gel to liquid crystal transition region of dipalmitoylphosphatidylcholine the relaxation process being followed by the change of the fluorescence of the probe dansylphosphatidylethanolamine embedded in the lipid phase.

In the experimentation 0.25 to 1.5 lipid/mL suspensions in 0.1M NaCl pH 5.5 were used. Weighted amounts of dipalmitoylphosphatidylcholine (Sigma USA, P6138) and dansylphosphatidylethanolamine (a gift of Professor C. Lussan, Bordeaux, France) were first dissolved in chloroform. The required volume of organic solution was

evaporated to dryness with a stream of nitrogen gas, then the aqueous milieu was added after it had being deoxygenated by bubbling nitrogen. Homogenization was achieved at 50°C with repeated Vortex mixing, above the transition temperature (4). The probe to lipid molar ratio was 1:250 and the dispersion were used within a few hours after preparation.

Fluorescence spectra were recorded with the FICA 55 spectro-fluorimeter (ARL, France) working at a 7.5 nm resolution, and the temperature of the observation cell was kept constant to within $\pm$ 0.1°C. To minimize possible artifacts due to sedimentation, the following time-sequence of operations was used : temperature equilibration, manual mixing of the cell content, then a constant delay of five minutes prior to spectrum recording (a second spectrum run immediatly was almost identical to the original one).

Temperature-jump experimentation was conducted in a home-built set-up based on the description given by Rigler et al (7) with modifications concerning mainly the optics and resulting in an increased sensitivity (8). Observation cells and heating device were from Messanlagen (Germany). The light source used was an XBO lamp from Osram (Germany) and the regulated power supply was from Spotligh (France). Transients were observed on the oscilloscope and recorded simultaneously in a Datalab DL 905 recorder (England) coupled either to a chart potentiometric

recorder or to a Texas ASR tape recorder (USA). The size of the jump was 0.1°C (6). Fluorescence was excited at 340 nm ($\Delta \lambda$ = 6.6 nm) and emitted light was selected with use of a Kodak 4 long wavelength pass filter (USA)

In the range of temperature ascribed to the pretransition and to the sharp melting transition of the host lipid (33°C to 42°C) the fluorescence of dansylphosphatidylethanolamine showed a distinctive plateau region (37 to 38°C) then a more pronounced decrease in intensity (38 to 41°C) as compared to the base-line temperature profile on both sides of the domain. Increasing temperature results in both a reduced fluorescence intensity and a red shift (fig. 1). These properties are in qualitatively good agreement with the observations reported earlier by Faucon and Lussan (4) for the change of anisotropy of the same probe in the same environnement. These changes were interpreted by the authors as indicative of the transition between $P_{\beta'}$ and L_{α} states in Luzzati's nomenclature (9).

As already discussed by Tsong (6), the joule heating temperature-jump method (10) can be used with lipid suspension and very small if any associated electrical field effect are expected to occur provided that the size of the temperature jump be kept very small (0.1°C in our study).

At all temperature used, a signal was present in the 1-10 μs time range that was too fast to be studied further. When the temperature was set to within the transition region a single major exponential relaxation process was observable in the 0.01 s time range (fig. 2). The relaxation time of this process showed a sharp maximum culminating at 38 .4°C and was practically undetected either at temperatures below 37.9°C or higher than 40°C (fig. 3). In addition, a slower relaxation process was detected in the 10s time range with a decay being clearly not an exponential. However, due to temperature drifts following the jump and to associated convection in the solution investigation of this slow reaction was not conducted further. In fact this time range is known to be out of the usable time scale in classical temperature jump experimentation.

The very fast relaxation could either be due to a direct physical perturbation of the fluorescence of the probe or most probably to a transport of solvent molecules through the lipid leaflets as reported by other groups using temperature jump experimentation with light scattering detection (6, 11, 12).

The major relaxation observed in the millisecond time range with the fluorescence detection is strikingly similar to the rela-

xation process with time constant τ_2 described by Tsong and Kanehisa (6). The similarity concerns not only the absolute value of the relaxation time but extends to the shape of the very sharp spike profile of the temperature dependance in the phase transition region. We note however that the position of τ_{max} is lower by about 1.5°C as compared to the position observed by Tsong using turbidimetry measurements. Moreover, no trace was found till now of a fluorescence relaxation in the second time range for which turbidity revealed a slow process with time constant τ_1 so that we can rule out the possibility that fluorescence changes be simple feedback effects of the turbidity changes.

Following currently accepted views (13, 14), the apparent shift to a lower temperature of the observed relaxation may be due merely to the probe acting as an impurity though present at a 1:250 molar ratio. Since dansylphosphatidylethanolamine is known to probe the glycerol moiety (15) which is considered to be of low fluidity in the lipid assembly (2) we would rather suggest that the glycerol region is involved as the very trigger of the phase transition and that the changes of fluorescence observed monitor the early kinetic events of the overall transition.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Professor A. BAUDRAS for his criticisms and help concerning the manuscript.

ABBREVIATIONS

DPC : dipalmitoylphosphatidylcholine.

DPE : dansylphosphatidylethanolamine.

REFERENCES

1 - H.J. HINZ and J.M. STURTEVANT,

J. Biol. Chem, 247, (1972), 6071-6075.

2 - J. SEELIG,

Quat. Rev. Biophys., 10, (1977), 353-418.

3 - S. MITAKU, A. IKEGAMI and A. SAKANISHI,

Biophys. Chem., 8, (1978), 295-304.

4 - J.F. FAUCON and C. LUSSAN,

Biochim. Biophys. Acta, 307, (1973), 459-466.

5 - C. LUSSAN and J.F. FAUCON,

FEBS. Lett., 19, (1971), 186-188.

6 - T.Y. TSONG and M.I. KANEHISA,

Biochemistry, 16, (1977), 2674-2680.

7 - R. RIGLER, C.R. RABL and T.M. JOVIN,

Rev. Sc. Instrum., 45, (1974), 580-588.

8 - J. TEISSIE,

Unpublished.

9 - V. LUZZATI,

Biol. Membr., 1, (1968), 71-123.

10 - M. EIGEN and L.C. de MAEYER,

Tech. Org. Chem., 8, (1963), 845.

11 - J.D. OWEN, P. HEMMES and E.M. EYRING,

Biochim. Biophys. Acta, 219, (1970), 276-282.

12 - T.Y. TSONG, T.T. TSONG, E. KINGSLEY and R. SILICIANO,

Biophys. J., 16, (1976), 1091-1104.

13 - N. ALBON and J.M. STURTEVANT,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, (1978), 2258-2260.

14 - M.P. ANDRICH and J.M. VANDERKOOI,

Biochemistry, 15, (1976), 1257-1261.

15 - A.S. WAGGONER and L. STRYER,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, (1970), 579-589.

FIGURE 1 :

Fluorescence changes of DPE during DPC phase transition

A - Equilibrium melting curves - Heating and cooling curves were identical - Fluorescence changes observed at 520 nm as emission wavelength with excitation at 340 nm - The time elapsed between two consecutive recordings of spectra was 15 min.

B - Temperature induced changes of emission spectra = the upper curve was recorded at 21.2°C, the lower at 44.2°C Excitation wavelength was 340 nm.

Conditions = 0.7 mg/mL lipids disperserd in 0.1 M NaCl at pH 5-5. The probe to lipid molar ratio was 1 to 250.

FIGURE 2 :

The kinetics of the crystalline-liquid crystalline phase transition of DPC dispersions : lipid concentration was 1 mg/mL in 0.1 M NaCl, pH = 5.5 ; temperature jump from 38.2°C to 38.3°C ; fluorescence of DPE was used to monitor the reaction. Electronic time constant was 0.5 ms. The probe to lipid molar ratio was 1 to 250. If max is the steady intensity recorded 1 s after the jump.

FIGURE 3 :

Temperature dependence of the relaxation times for the fluorescence change of DPE correlated with the crystalline-liquid crystalline phase transition of DPC. A maximum is observed at 38° 4. Conditions were as described in figure 2.

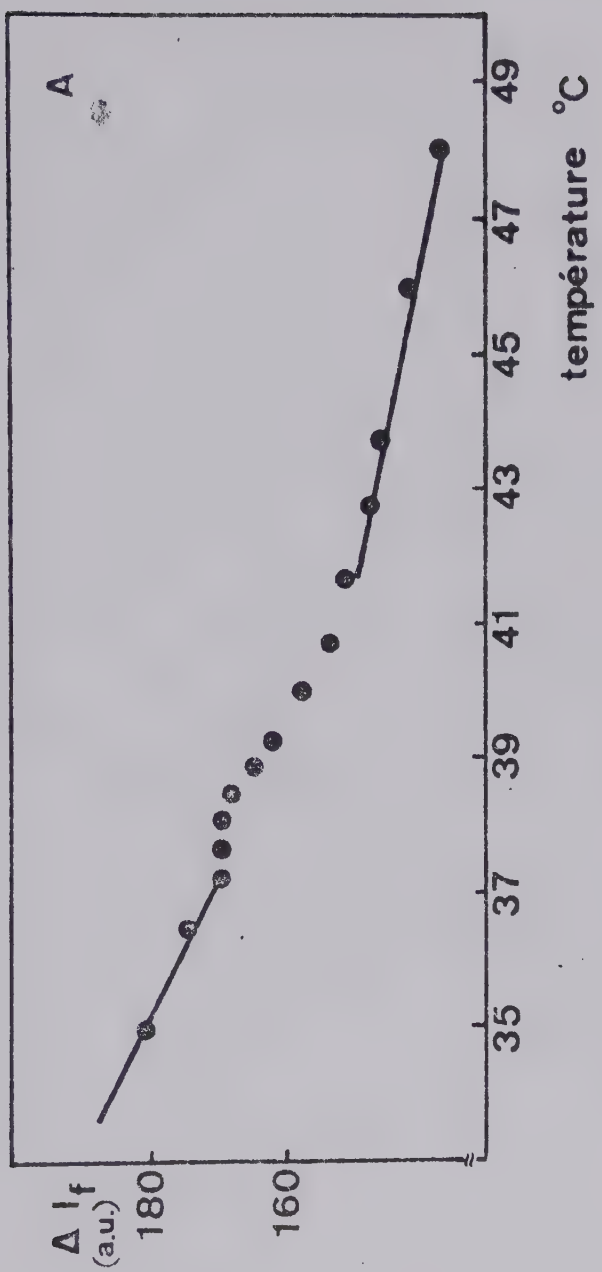


FIGURE 1

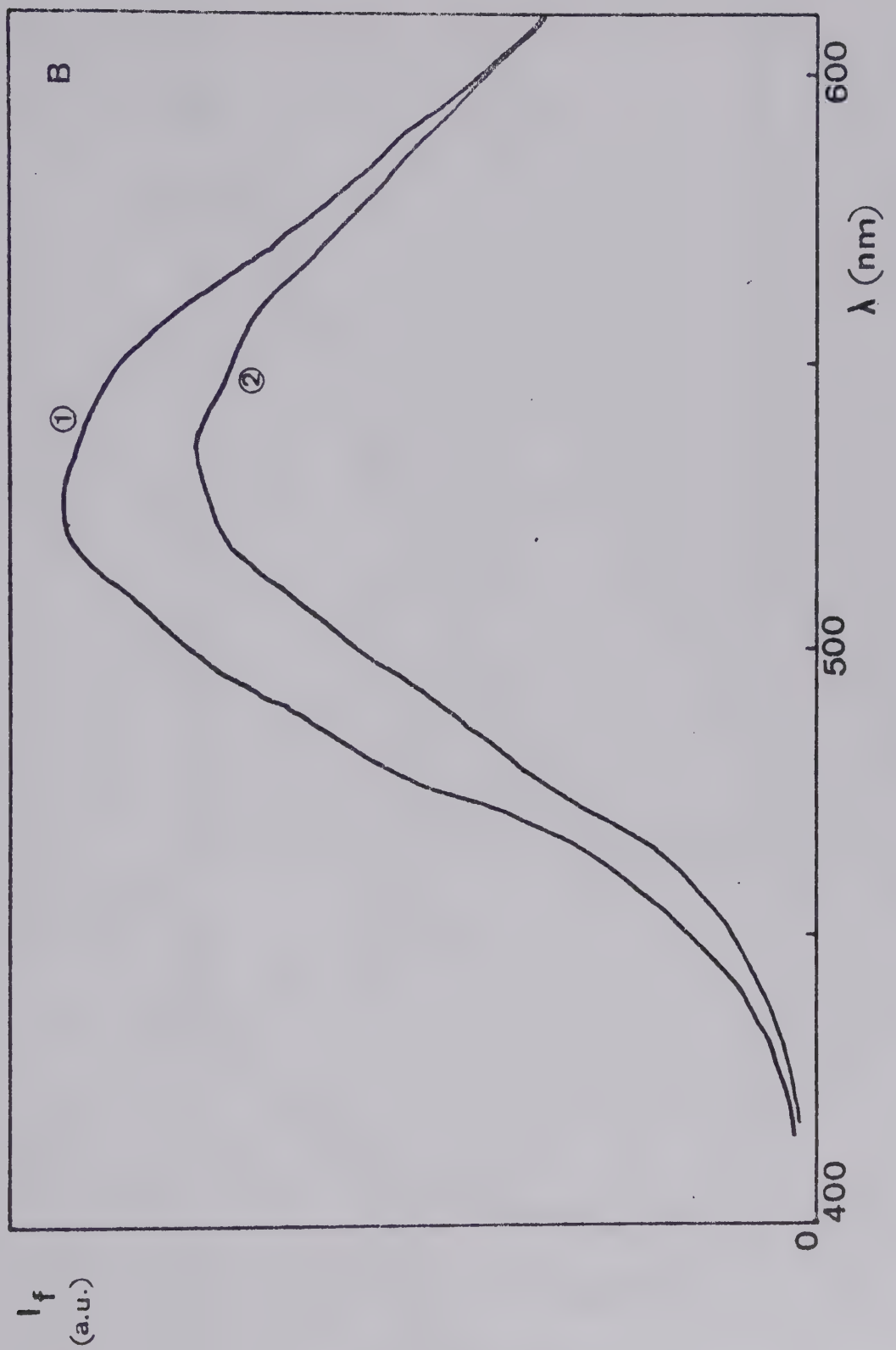


FIGURE 1

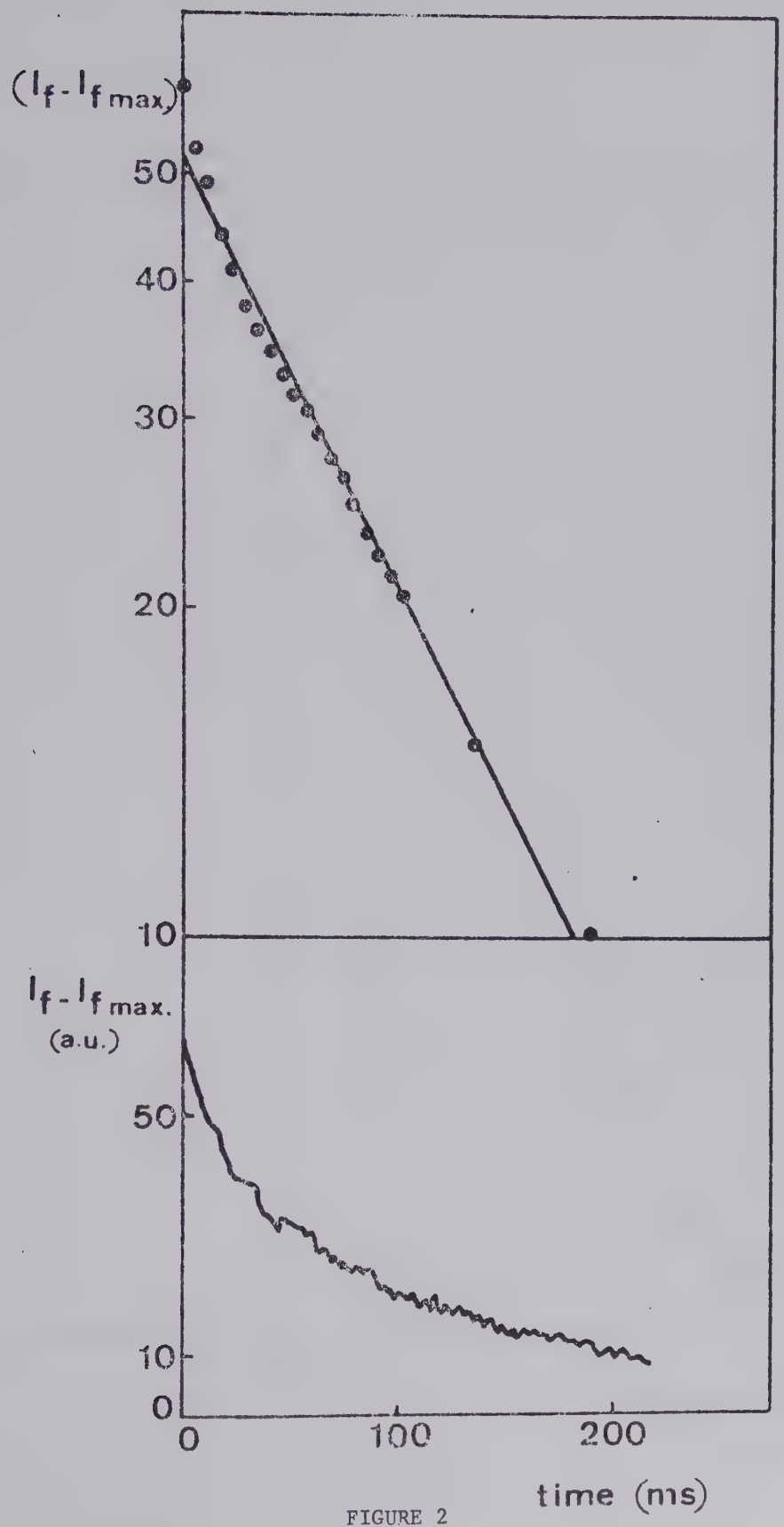


FIGURE 2

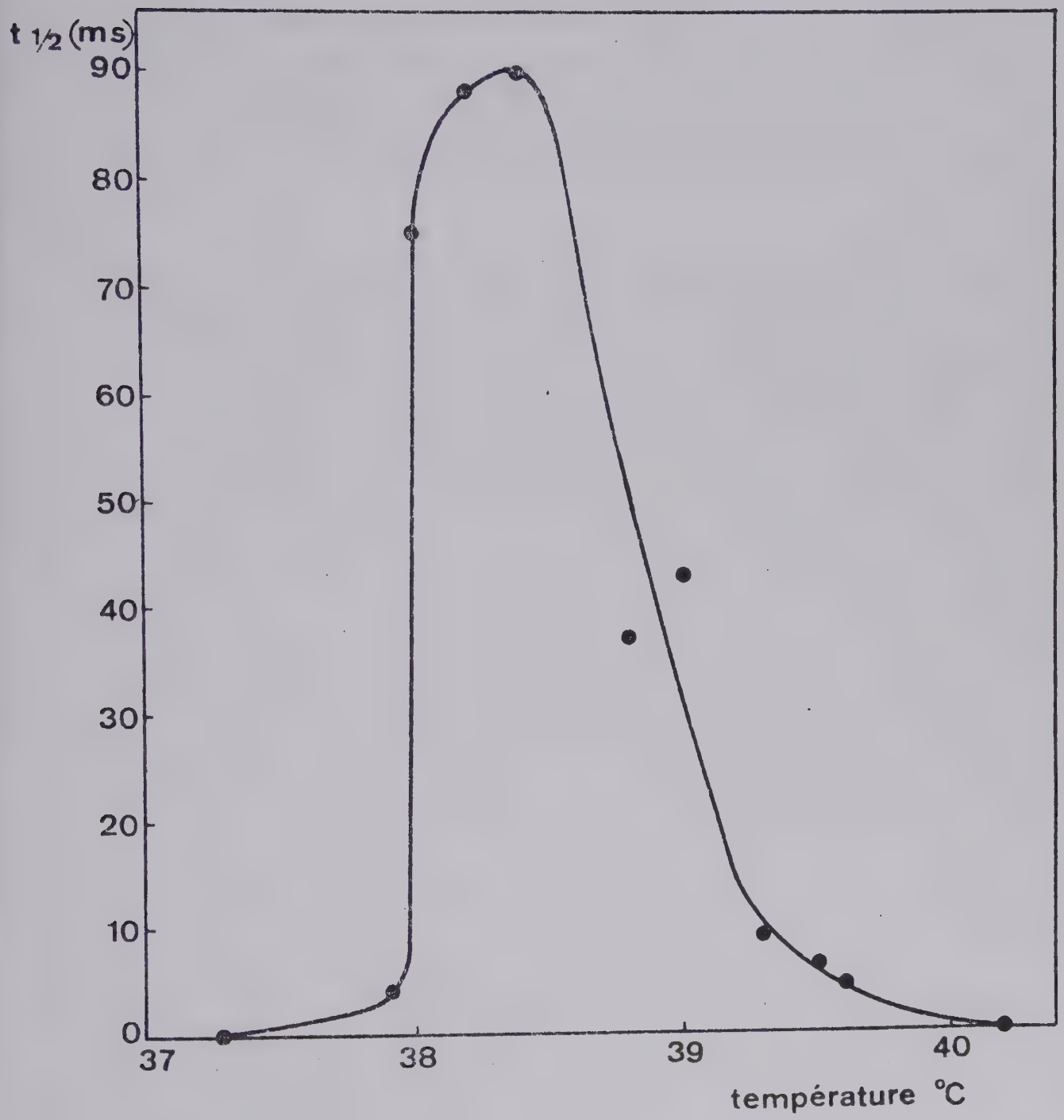


FIGURE 3

RESUME

Les mesures de photoaveuglement et de retour de fluorescence après photoaveuglement ont été utilisées sur le système de monocouches étalées à l'interface air/eau. Un calcul de simulation permet l'obtention du coefficient de diffusion transverse d'espèces présentes dans le film. Cette méthode a été appliquée aux systèmes de DPC et de DPG étalés en monocouches sur des sous-phases contenant diverses concentrations en ions, le marqueur photosensible étant l'acide 12-(9-Anthroyl) stearique. Les conclusions suivantes sont tirées de cette étude :

1) le marqueur forme des "microdomaines" au sein du film, où ses propriétés de fluorescence ne dépendent pas de l'état du phospholipide-hôte
2) une diminution brutale du coefficient de diffusion est détectée lors de la compression des monocouches. Elle correspond à la transition entre les phases liquide expansé et gel, lorsque cette transition existe.
3) dans le cas du DPG, phospholipide acide, la vitesse de diffusion de l'AS est fonction du contenu et de la nature des ions présents dans la sous-phase.

Eur. J. Biochem. *83*, 77–85 (1978)

A Fluorescence Approach of the Determination of Translational Diffusion Coefficients of Lipids in Phospholipid Monolayer at the Air-Water Interface

Justin TEISSIE, Jean-François TOCANNE, and Alain BAUDRAS

Centre de Recherches de Biochimie et de Génétique Cellulaires du Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse

(Received May 24/October 13, 1977)

In the present work, it is shown that the photobleaching technique as well as experimentation based on fluorescence recovery after bleaching can be extended to monolayers spread at the air-water interface. A mathematical model is derived which allows the determination of translational diffusion coefficients of species diffusing in such a system. Using 12-(9-anthroyl)stearic acid (anthroylstearate) as a fluorescent probe, dispersed either in dipalmitoylphosphatidylcholine or in dipalmitoylphosphatidylglycerol in various conditions of subphase ionic composition and surface pressure of the monolayer, including phase transition domains, we are led to the following conclusions:

1. Anthroylstearate molecules seem to aggregate in 'microdomains' where their fluorescence properties remain unchanged regardless of the compression states of the host monolayer.
2. In any case, a break in the diffusion constants appears on compressing films of both dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol. In particular, this break coincides with the liquid expanded to gel phase transition of these lipids when it occurs.
3. Diffusion of anthroylstearate in dipalmitoylphosphatidylglycerol depends strongly on the subphase ionic strength and on the nature of cations: Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}.

In recent years, much interest has been expressed in the study of lateral diffusion of phospholipids and proteins in biomembranes. Such a process which participates in the more general concept of 'membrane fluidity' seems to play a significant role in modulating membrane functions of some proteins [1]. Many of the studies reported on lateral diffusion have been carried out by use of spectroscopic methods, basically electron spin resonance [2], nuclear magnetic resonance [3], and fluorescence. In this case, lateral diffusion coefficients could be estimated for fluorescent probes dispersed in a lipid environment, particularly with pyrene [4] or derivatives of 9-anthroylcarboxylic acid [5] which have been reported to be well suited for such determinations. Values of these diffusion coefficients were calculated either indirectly from photobleaching experiments with reference to the behaviour of the probe in organic solvents [5] or directly from the analysis of the kinetics of excimer formation [4] or of fluorescence recovery after photobleaching [6, 7]. Most of these investigations have been conducted either on biomembranes [8] or on membrane models such as liposomes [9] and multilayered systems [2], whereas experimentation on monolayers have been scarce and based on the use of radioactive tracers [10]. Lipid monolayers at the air-water interface have proved to be good membrane models in which not only the temperature and subphase pH and ionic composition can be controlled, but also the molecular packing of the lipids. We have reported recently [11] that fluorescence measurements are feasible with such monolayers at very low concentrations of the probe (mole ratio of the order of 1 : 100).

In the present work, the photobleaching technique has been extended to monolayers and the experimentation based on fluorescence recovery after bleaching as well. A mathematical treatment of the data has been derived which allows the determination of translational diffusion coefficients in such a system. The results presented deal with the diffusion of 12-(9-anthroyl)stearic acid (anthroylstearate) dispersed either in dipalmitoylphosphatidylcholine or in dipalmitoylphosphatidylglycerol in various conditions of subphase ionic composition and surface pressure of the monolayer, including phase transition domains.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Dipalmitoylphosphatidylcholine and 12-(9-anthroyl)stearic acid were purchased from Sigma (U.S.A.). Dipalmitoylphosphatidylglycerol was synthetized in our laboratory [12]. All these compounds were pure as considered by thin-layer chromatography. Salts were of analytical grade. Ultra pure water for semi-conductor industry (Motorola, Toulouse, France) was used throughout the experimentation. Solvents were spectroscopically pure.

Monolayer and Fluorescence Experimentation

Monolayer and fluorescence experiments were carried out as already described [11] at a constant temperature of 20 °C. Nevertheless, it must be pointed out that in our fluorescence apparatus, the illuminated area (nearly circular) had a radius of 2 mm and was liable to small modifications, depending on the relative position of the monolayer plane with regard to the illuminating set-up. Filters used were Schott UG1 for excitation and MTO 10817 for observation. Electronic time constant was set at 5 s, a value which did not interfere with the rate constant of the photodimerisation reaction and which gave a good signal to noise ratio (50/1). Controls showed that identical rate constants were obtained when this time constant was reduced to less than 1 s. During all experiments, the intensity of the incident light was checked to keep it constant.

The data were read either on a digital meter or by use of a recorder with a time constant smaller than 1 s (full scale). The rate constants of the photodimerisation reaction were obtained through a least square analysis of the data, using a Wang 2200 minicalculator.

THEORETICAL ANALYSIS OF THE SYSTEM

Photodimerisation of 12-(9-Anthroyl)stearic Acid

Anthroylstearate and several other 9-substituted anthracene derivatives [13,14] can be converted into photodimers under near ultraviolet irradiation according to the mechanism:

$$AS + h\nu\,(\# 360\text{ nm}) \rightarrow AS^* \qquad (1)$$

$$AS + AS^* \rightarrow (AS)_2 \qquad (2)$$

where AS is anthroylstearate.

At the same time, fluorescence is emitted by excited monomers while the dimeric product of Eqn (2) is not fluorescent:

$$AS^* \rightarrow AS + h\nu\,(\# 480\text{ nm}) \qquad (3)$$

Hence, the decrease with time of the intensity of the fluorescence observed reflects the kinetics of Eqn (2) which is a second-order reaction with a rate equation:

$$\frac{d[AS]}{dt} = -k[AS]^2 \qquad (4)$$

in which [AS] represents the monomer concentration which is linearly correlated to the fluorescence intensity

$$I_f = h[AS]. \qquad (5)$$

The constant h is known to depend on the fluorescent probe environment (nature of the phospholipids, molecular packing) [15] and, in the case of monolayers, on the geometry of the fluorescence apparatus [11]. From Eqns (4) and (5) the integrated rate law for fluorescence is obtained:

$$\frac{1}{I_f(t)} - \frac{1}{I_f(t=0)} = \frac{k}{h}\,t \qquad (6)$$

where k/h is the slope of the straight line which is to be observed when the reciprocal fluorescence intensity is plotted versus time; k is the rate constant of Eqn (2) which is diffusion limited; h can be determined by extrapolating the reciprocal fluorescence intensity at time $t = 0$.

For the photodimerisation to take place, the AS and AS* molecules have to come in close contact. Moreover, in the highly organized two dimensional lattice a monolayer is, the dimer $(AS)_2$ will form only when the reacting species will be correctly oriented with respect to each other. Indeed, it must be kept in mind that in AS, the naphthalene ring lays parallel to the hydrocarbon chain [16] and that in the dimer, linkages between the two naphthalene residues can occur at the 9-9′ and 10-10′ or 9-10′ and 10-9′ positions [13,14]. Therefore, it can be reasonably assumed that within the monolayer, the photodimerisation kinetics will depend both on lateral and rotational diffusion of the lipids.

In other respects, ultraviolet illumination is known to induce peroxidation of naphthalene derivatives [5]. Actually, interferences of that kind with our fluorescence measurements could be ruled out from the following arguments: firstly, peroxidation is a first-order reaction and we do observe purely second-order kinetics; secondly, after exposure to light of short wavelength (280 nm) which dissociates the dimer, a previously bleached area was observed to recover almost completely its original fluorescence level when excited with light at 360 nm. This is well demonstrated with monolayers in the gel phase for which lateral diffusion is particularly slow (see the forthcoming results).

In the present work, photodimerisation (step 2) has been studied by following the decrease of the fluorescence signal obtained under intense illumina-

tion conditions. Under such conditions, the photodimerisation process is very fast. Therefore, perturbations due to exchanges of molecules between the illuminated and non-illuminated parts of the monolayer, mediated by lateral diffusion, can be ignored. No attempt was made to get information on the conformations of the dimer (tail-head or head-head linkage).

Translational Diffusion of 12-(9-Anthroyl)stearic Acid in Monolayers

As described in the preceding section, illuminating the monolayer leads to the formation of photodimers with a correlated decrease of the fluorescence signal.

If after photobleaching, the system is then left standing in the dark for a certain time, the observed area is expected to replenish progressively with monomers due to the translational diffusion. The fluorescence signal observed when illuminating the monolayer again for a short period will increase with the duration of the dark period and will tend to reach the initial signal value. It should be noted that the photobleached area being small as compared to the total surface area, the monolayer constitutes a reservoir of monomers and a sink for the photodimers produced.

Mathematical descriptions of lateral diffusion have already been given by others [6,17] for various membrane models. The sophisticated solutions which have been proposed for planar systems [6] cannot be used without powerful computers. For that reason, we thought it was interesting to develop a new formalism, which suffers from somewhat less realistic boundary conditions, but allows a quite rapid treatment of experimental data and yields good approximate values of the diffusion coefficients.

Starting from the diffusion equation:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D\vec{v}^2 c \qquad (7)$$

where $\vec{v}^2$ is the laplacian operator, the diffusion on the surface of a plane was analysed as follows. On account of the axial symetry of the monolayer, the system is best described with reference to cylindrical coordinates (r, θ, z). With z = constant and c being independent of θ, the diffusion law turns to be

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D\left(\frac{\delta^2 c}{\delta r^2} + \frac{1}{r}\frac{\delta c}{\delta r}\right) \qquad (8)$$

where D is the lateral diffusion coefficient, $c = c(r,t)$ is the concentration of the diffusing species at a distance r from the origin and at time t.

The following boundary conditions are chosen: at time zero, which is the instant when the photobleaching light is turn off, the concentration of monomers is considered as uniform within the surface previously illuminated,

$$c(r,0) = c_1 \quad 0 < r < R \qquad (9)$$

where R is the radius of the illuminated area supposed to be circular (this is an approximation since the real shape is elliptic in our apparatus [11]), the origin of the coordinates being the center of this area. Outside this area, the concentration of monomers is considered to be uniform

$$c(R,t) = C_0 \quad t \geq 0 \qquad (10)$$

with

$$C_1 < C_0$$

with time, $c(r,t)$ should stay finite.
Taking:

$$\begin{aligned} c &= c_1' + c^* \\ c_0^* &= c_0 - c_1 \end{aligned} \qquad (11)$$

lead to

$$\frac{\delta c}{\delta t} = \frac{\delta c^*}{\delta t} \quad \text{and} \quad \vec{v}^2 c = \vec{v}^2 c^*.$$

The boundary conditions turn out to be:

$$\begin{aligned} c^*(r,0) &= 0 \quad 0 < r < R \\ c^*(R,t) &= c_0^* \quad t \geq 0 \end{aligned}$$

and from Eqn (8)

$$\frac{\delta c^*}{\delta t} = D\left(\frac{\delta^2 c^*}{\delta r^2} + \frac{1}{r}\frac{\delta c^*}{\delta r}\right). \qquad (12)$$

A solution of this equation was adapted from results found in applied mathematics textbooks [18,19]:

$$c^*(r,t) = c_0^*\left[1 - 2\sum_{n=1}^{\infty}\frac{J_0\left(\alpha_n \frac{r}{R}\right)}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\alpha_n^2 \frac{D}{R^2} t\right)\right] \qquad (13)$$

in which J_0 and J_1 are Bessel functions of first kind and order 0 and 1 respectively; α_n are the roots of $J_0(x)$.

Coming back to the concentrations, one obtains

$$\begin{aligned} &c_0 - c(r,t) \\ &= 2(c_0 - c_1)\left[\sum_{n=1}^{\infty}\frac{J_0\left(\alpha_n \frac{r}{R}\right)}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\alpha_n^2 \frac{D}{R^2} t\right)\right]. \end{aligned} \qquad (14)$$

With the experimental set up, the observed fluorescence intensity gives a value of c averaged on all the surface $(0 \leq r < R)$.
Hence,

$$\frac{I_0 - I(t)}{I_0 - I_1} = 2\sum_{n=1}^{\infty}\frac{\exp\left(-\alpha_n^2 \frac{D}{R^2} t\right)}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} 2\int_0^1 J_0(\alpha_n \varrho)\varrho\, d\varrho \qquad (15)$$

where I_0 is the fluorescence intensity if no photodimerisation occurs, that is the fluorescence intensity at the very beginning of the experiment. I_1 is the fluorescence intensity at the end of the illumination and $I(t)$, the recovered fluorescence after a given dark period t.

From the relationship

$$xJ_0(x) = \frac{d}{dx}[xJ_1(x)] \qquad (16)$$

the integral is easily calculated to give:

$$\frac{I_0 - I(t)}{I_0 - I_1} = 4 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp\left(-\alpha_n^2 \frac{D}{R^2} t\right)}{\alpha_n^2}. \qquad (17)$$

Taking into account the diffusion coefficient values that may be obtained and the duration of the experiments, it appeared reliable to limit the infinite sum of exponentials to $n = 4$. The right term of Eqn (17) was computed using α_n from tables [20] and for different D and t values. Then, diffusion coefficients D were obtained through a graphical resolution of Eqn (17).

The determination of the diffusion coefficient D is strongly dependent on the value of R, that is on the surface of the illuminated area. Owing to the convergent shape of the incident light beam, this surface area depends on the level of the monolayer relatively to the optical set-up. Some irreproducibility in the adjustment of this level could explain the rather large error on the experimental determination of D as described below. Moreover, fluctuations of the intensity of the exciting beam can affect the values of I_0, I_1 and $I(t)$. Nevertheless reproducible values of D were obtained throughout each set of experiments in which the position of the through was not changed.

It must be pointed out that the range of D values which can be obtained by means of this technique is limited. Thus, in the fluid state, lateral diffusion must be slow enough to allow the initial condition (dimer only present in the illuminating area) to be filled. For rather rigid system, the experiment time would be too long (more than 1 h) with respect to the stability of the monolayer. More precisely, it was possible to measure diffusion coefficients of anthroylstearate in host phospholipid monolayers ranging from 1.5×10^{-4} cm^2/s to 1×10^{-7} cm^2/s, with an accuracy of about 20%.

The simplifying conditions we used in Eqn (10) by introducing an higher value of the concentration gradient at the boundary of the previously illuminated area results in apparent diffusion coefficients with underestimated values. In that respect, making use of the graph solution of the equation given by Axelrod *et al.* [6] leads to values about three-fold higher than ours, and that over the whole range of diffusion coefficient measurable with our technique. This is considered not all the more important since, in many cases, experiments do not rely on absolute values of diffusion coefficients but rather on their relative variations as a function of various physical conditions applied to the membrane system, as exemplified in the present paper.

RESULTS

12-(9-Anthroyl)stearic Acid as a Probe in Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers

As described elsewhere [11], the reduced fluorescence intensity (total fluorescence intensity divided by the number of probes) of anthroylstearate embedded in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers, observed after a 15-s illumination time, showed a small but definite maximum at the beginning of the liquid to gel phase transition (Fig. 1). This result was ex-

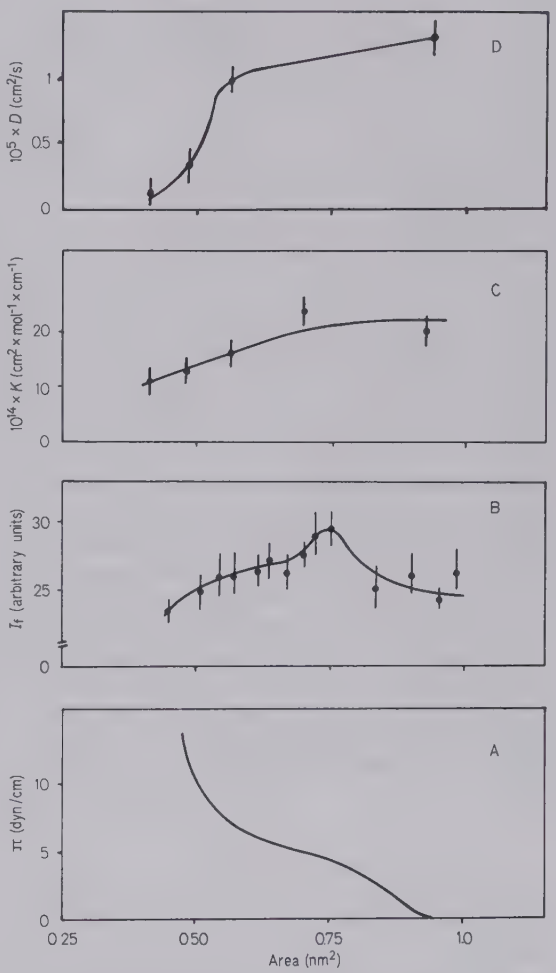


Fig. 1. *Monolayer experiments relative to dipalmitoylphosphatidylcholine 12-(9-anthroyl)stearic acid (100 1) mixtures, on 100 mM NaCl near pH 6.* The following changes are shown, as a function of molecular area: (A) surface pressure; (B) reduced fluorescence intensity; (C) photodimerisation rate constants; (D) translational diffusion coefficients. (A) was recorded by continuous film compression; (B), (C) and (D) were obtained by stepwise addition of the lipids. Excitation and observation wavelengths were respectively 360 nm ($\Delta\lambda$ = 60 nm) and 476 nm ($\Delta\lambda$ = 10 nm)

Table 1. Photobleaching and diffusion constants of anthroylstearic acid as a function of the compression state of different monolayers

Anthroylstearic acid	Molecular area	Surface pressure	$10^{14}\times$ Dimerisation rate constant	$10^{6}\times$ Diffusion constant
	nm^2	dyn/cm	$cm^2\times mol^{-1}\times min^{-1}$	cm^2/s
Pure	0.43	12.5	8.0 ± 0.8	–
(subphase: 100 mM NaCl, pH ≈ 6)	0.40	21.8	9.0 ± 0.8	50
	0.375	25.8	2.5 ± 0.2	10
	0.35	26.4	1.8 ± 0.2	9.5
In dipalmitoylphosphatidylcholine	0.95	0.2	20	13 ± 2
(subphase: 100 mM NaCl, pH ≈ 6)	0.71	3.1	23.5	–
	0.56	5.5	16.4	10
	0.48	8.1	13.5	5.5
	0.42	15.7	11	4
In dipalmitoylphosphatidylglycerol	0.80	1.2	44.6 ± 3	1.5
(subphase: pure water, pH ≈ 6)	0.62	2.5	13.7 ± 1.5	2.8
	0.51	9.3	14.8 ± 1.5	0.1
	0.43	18	11.8 ± 1	0.1
In dipalmitoylphosphatidylglycerol	0.70	14.2	11.4 ± 1.5	26.6
(subphase: 100 mM NaCl, pH ≈ 6)	0.51	23.6	16.8 ± 1.3	0.6
	0.43	36.2	21.7 ± 1.5	0.1
In dipalmitoylphosphatidylglycerol	0.64	12.5	20.7 ± 0.6	3.8
(subphase: 10 mM $MgCl_2$, pH ≈ 6)	0.57	17.2	23.2 ± 2.5	2.4
	0.51	22.6	22.4 ± 1.7	0.1
In dipalmitoylphosphatidylglycerol	0.95	0.2	34.6 ± 3	13
(subphase: 10 mM $CaCl_2$, pH ≈ 6)	0.80	0.2	23.0 ± 3	24
	0.70	0.6	20.0 ± 4	0.1
	0.57	5.2	20.0 ± 5	0.1

plained by an environment modification and/or reorientations of the probe.

As mentioned in Methods, the dimerisation consecutive to ultraviolet irradiation was studied for different compression states of the monolayer. With illumination, a decrease of the emitted fluorescence was immediately observed. The reciprocal plot of the fluorescence intensity versus time was linear, proving the second-order character of the reaction. The slope of this curve gave the rate constant which only slightly decreased with increasing surface pressure (Fig. 1, Table 1). After a long illumination time (longer than 3 min), in particular at low surface pressure (*i.e.* low surface concentrations), the second-order plot deviated from the expected straight line. A steady state could even be observed with a constant fluorescence intensity. It should be noted that such a behaviour has already been described in the case of phospholipid multilayers [5].

It has been checked that the rate constants deduced from the early linear part of the curve did not depend on the probe to dipalmitoylphosphatidylcholine molar ratio (1 : 99 or 2 : 99). These ratio values were chosen as a compromise for a good signal to noise ratio, the concentration of the probe being increased within the limit of not disturbing the organization of the monolayers.

The values of the diffusion constant D for different compression states of the monolayer are ploted in Fig. 1 D. The curve exhibited a break at the end of the liquid to gel phase transition, the value of D decreasing by a factor of about 10, from more than 1.3×10^{-5} cm^2/s to less than 1.1×10^{-6} cm^2/s. Thus, it is clear that the film condensation in the gel phase corresponds to a considerable decrease of the fluidity of the system, as can be inferred from the measured diffusion coefficients.

Monolayers of 12-(9-Anthroyl)stearic Acid

Being an amphiphile molecule, anthroylstearate can form a monolayer at the air-water interface. In order to get some information about its behaviour in the postulated 'microdomains' (see the forthcoming discussion), the relative fluorescence intensity, photodimerisation rates and diffusion constants of the probe have been measured for different pressures of its films. As a general observation, the fluorescence intensity of anthroylstearate monolayers appeared rather unstable especially at large molecular areas ($\pi < 3$ dyn/

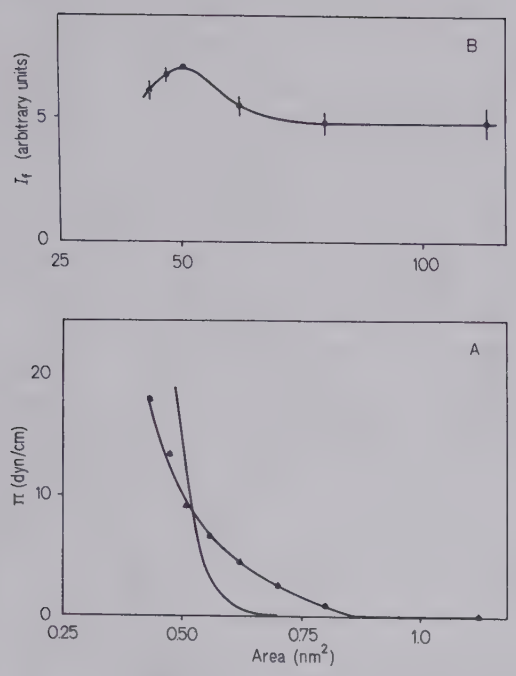


Fig. 2. *Monolayer experiments relative to dipalmitoylphosphatidylglycerol/12-(9-anthroyl)-stearic acid (100/1) mixtures, on pure water near pH 6.* (A) Compression isotherms, obtained either by continuous film compression (——) or by stepwise addition of lipids (●——●). (B) Changes in the reduced fluorescence intensity (arbitrary units) versus the molecular area, through stepwise addition of lipids. Optical conditions were as in Fig. 1

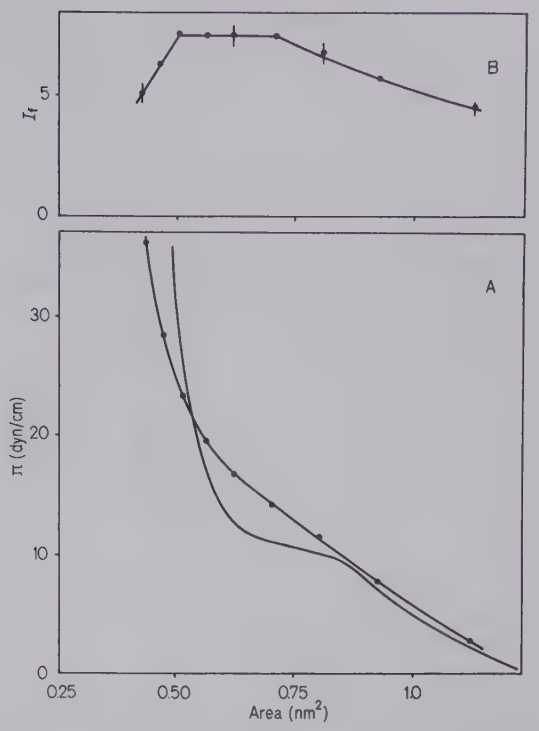


Fig. 3. *Monolayer experiments relative to dipalmitoylphosphatidylglycerol/12-(9-anthroyl)-stearic acid (100/1) mixtures, on 100 mM NaCl near pH 6.* Results and optical conditions as in Fig. 2

cm) where experiments became nearly impossible in this range of molecular packing.

For film pressures between 3 dyn/cm and the collapse pressure ($\pi = 26$ dyn/cm [16]) the relative fluorescence intensity remained constant. A small decrease only appeared near the collapse. The observed values were smaller than those obtained when the probe was embedded in an host phospholipid monolayer.

Results concerning photodimerisation rates are shown in Table 1.

Despite of the rather large experimental errors, the rate constants associated to tightly packed molecules were less than those found with expanded films. A sharp transition was observed at molecular area of 0.4 nm^2 about. Moreover, all the rate constants obtained were lower than those relative to anthroylstearate embedded in phospholipids, by a factor of at least 10. This suggests that under these conditions the reaction was less easy, even taking into account the slowing down of the reaction which can be inferred from the observed decrease of the fluorescence quantum yield [5].

Results of diffusion experiments shown in Table 1 correspond to high values of D near the upper limit of reliability of the technique (see Methods). Nevertheless, a sharp increase of the diffusion coefficient was detected at molecular area larger than 0.4 nm^2.

Thus, it appears that in the case of anthroylstearate monolayers, the photodimerisation rates and the diffusion constants vary similarly as a function of the molecular packing.

The high diffusion constant recorded (over 1×10^{-4} cm^2/s) could explain the instability which was observed all along these experiments. Concentrations changes could be the ground of these fluctuations.

12-(9-Anthroyl)stearic Acid as a Probe in Dipalmitoylphosphatidylglycerol Monolayers

Fluorescence experiments have been carried out on pure water, 100 mM NaCl,10 mM $CaCl_2$ and $MgCl_2$ near pH 6. Reduced fluorescence intensities, plotted versus the molecular area, are respectively given in Fig. 2, 3, 4 and 5 with the corresponding changes in surface pressure. As can be seen, the fluorescence curves do not differ in magnitude but in shape, when the subphase ionic content is changed.

On pure water, Ca^{2+} and Mg^{2+}, where phosphatidylglycerol can be considered as non-ionized [22],

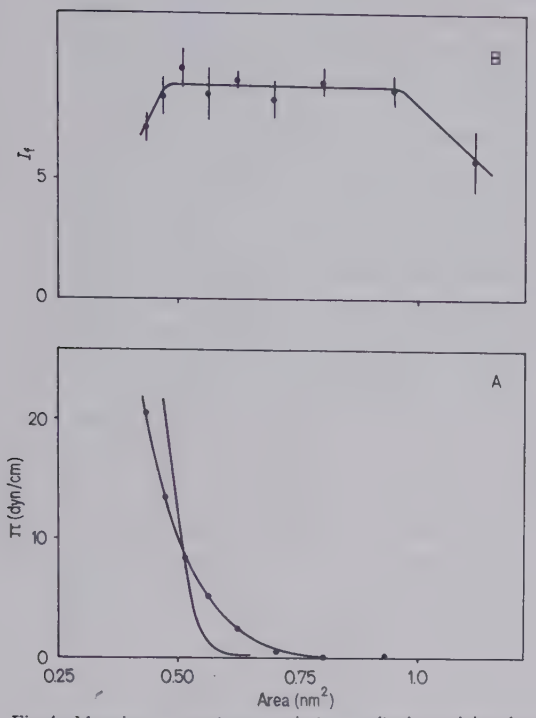


Fig. 4. *Monolayer experiments relative to dipalmitoylphosphatidylglycerol/12-(9-anthroyl)-stearic acid (100/1) mixtures, on 10 mM $CaCl_2$ near pH 6.* Results and optical conditions as in Fig. 2

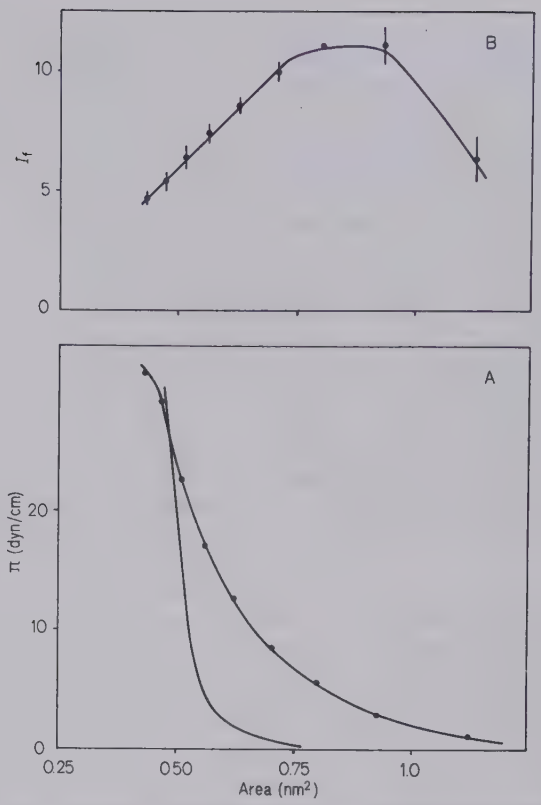


Fig. 5. *Monolayer experiments relative to dipalmitoylphosphatidylglycerol/12-(9-anthroyl)-stearic acid (100/1) mixtures, on 10 mM $MgCl_2$ near pH 6.* Results and optical conditions as in Fig. 2

a fluorescence increase was observed at the beginning of the film compression, followed by a plateau, then by a net decrease as the surface pressure reached a value of 10 dyn/cm about, that is in the region where this lipid certainly exists in a condensed phase. On Na^+, where it is known to be ionized at this pH (6) and ionic strength (100 mM) [23], a similar behaviour was observed. In this case, it must be noted that the intermediate plateau ranged in the molecular area region corresponding to that of the liquid to gel phase transition exhibited by the compression isotherm.

In any case, these results suggest that the reduced fluorescence intensity is strongly dependent on the film molecular packing which, in turn, depends on the ionic conditions.

With respect to photodimerisation, the rate constants measured on identical subphases are gathered in Table 1. It is apparent that neither the molecular packing nor the subphase ionic conditions significantly influenced the photodimerisation process. Nevertheless, films which are largely expanded on pure water are exceptions to this general rule, since the rate constant measured is higher by a factor of 4.

Diffusion constants measured under similar ionic conditions are given in the same table. At large molecular area, the diffusion clearly depends on the ionic content of the subphase. The lowest values were observed on pure water.

It is worth noting that these diffusion constants dropped sharply above a certain surface pressure, depending on the subphase ionic content. Ca^{2+} seemed the more effective in monitoring these diffusional changes. Moreover it must be observed that regardless of the subphase ionic conditions, the diffusion constants dropped to values lying under the lower limit of detection of our device, that is less than 1×10^{-7} cm^2/s.

DISCUSSION

One of the first questions arising from this study concerns the peculiar behaviour of the anthroyl-stearate probe in lipid monolayers. That the photodimerisation rate constants appeared nearly independent of the fluidity of the monolayer is somewhat surprising in considering the general chemical kinetic laws of isotropic solutions extended to a two-dimensional lattice. Indeed, one could expect a decrease of the photodimerisation rate constants in proportion

as the diffusion coefficients decrease. As already mentioned in the Methods section, both translational and rotational diffusion processes are involved in the photodimerisation reaction. Since they are known to behave similarly as a function of the fluidity [21], the hypothesis that their variations could compensate each other can be ruled out.

On the other hand, the discrepancy between dimerisation rates and diffusion constants for different compression states could be explained by a self organization of probe molecules in a way such to allow the molecules to react independently of the physical state of the host monolayer. In other words, anthroylstearate could segregate in 'microdomains' in which translation and rotation movements would stay unchanged regardless of the monolayer molecular packing. The change in dimerisation rate constants observed after a long time could be explained in considering that in the illuminated area, the disparition of the monomers by photodimerisation is counterbalanced by their replenishment from the non-illuminated region through diffusion, up to reach a certain equilibrium. Such an explanation for the break in dimerisation rate constants of anthroylstearate in phospholipid multilayers has already been proposed [5], but no parallel diffusion measurements were carried out. By investigating the fluorescence properties of anthroylstearate monolayers, attempts have been made to gain some information on the constitution of these aggregates. Unfortunately our results proved unsuccessful in discriminating between at least two hypotheses: firstly, the probe molecules could be envisaged in a quasi 'crystalline state', with the naphthalene rings orientated parallel, preventing large anthroylstearate motions but allowing the photodimerisation; secondly, in contrast, the probe molecules would be considered quickly moving and rotating. Unfortunately, the size of these microdomains remains difficult to define. Nevertheless, it is likely to be dependent on the ionic conditions in the subphase, owing to the carboxyl group of the probe. Some influence of the film pressure cannot be excluded.

Thus, the possible segregation of anthroylstearate in microdomains should be kept in mind when such a probe is used in membrane studies. In particular, this might be critical when studying protein binding to membranes throughout energy transfer measurements as already described [24]. In the same way, the use of photodimerisation rate constants as a scale for membrane fluidity [5] should not be relevant. Indeed, in our opinion the photodimerisation process is mainly restricted to the anthroylstearate microdomains and not directly connected to the diffusion of free probe molecules across the membrane.

It is worthwhile noting that such a probe segregation has already been reported for other derivatives (spin labelled) of stearic acid [25]. Nevertheless, these anthroylstearate microdomains can migrate across the monolayer as a whole, still obeying classical diffusion laws. Provided that the size of these aggregates stay nearly constant throughout all experiments, fluorescence recovery measurements can afford a relative scale of the monolayer fluidity as a function of the film pressure. Therefore, the main result concerns the occurrence of a sharp change in the measured diffusion coefficients above a certain film pressure. These coefficients differ by a factor 10 with dipalmitoylphosphatidylcholine and by a factor larger than 50 with dipalmitoylphosphatidylglycerol, results indicative of both sharp and drastic changes in the fluidity of the lipid matrix. Considering the compression isotherms of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol spread on a subphase containing NaCl, the diffusion transitions can be associated to the end of the liquid-expanded to gel phase transitions.

Subphase ionic conditions have been shown to have a pronounced effect on the molecular packing of phosphatidylglycerol in monolayers [22,23] and bilayers [22,26–28]. The more condensed films were still observed on pure water (pH 6), an observation interpretable in terms of full protonation of the lipid [23]. Addition of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the subphase brings about film condensation, that means a neutralization of the phosphate anionic charge by these cations [22]. With dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers and at 20 °C, such neutralizations lead to the existence of the lipid in the condensed phase only, as proved by the continuous compression isotherms shown in Fig. 4 and 5. As already reported [11], stepwise addition of lipids gave compression curves which are somewhat more expanded than the ones obtained by a continuous compression (moving barrier system). Such differences, originating in the way the films are formed have recently been discussed [30]. Nevertheless it is thought that the diffusion transition has only to be connected to the appearance of a well defined gel state.

All this discussion lies on the assumption of a steady size of anthroylstearate microdomains. As already pointed out, the number of associated molecules is liable to vary with the lipid molecular packing. Such a change cannot be ignored and could partly account for the observed diffusion transition. If it were the case, the transition should be linked to structural changes within the lipid matrix and no longer only to a fluidity transition.

In any case, ions from the aqueous phase appear to modulate the diffusion of the probe across the model membrane. Such an effect could be of great importance in some biological membrane functions. Translational diffusion can be considered as fundamental [1] in regards to the recently hypothesized models of bio-

logical membranes [29]. The changes in diffusion properties induced by ionic fluxes as it has just been described could play a role in the modulation of enzymatic activities.

At last, it is noteworthy to observe that diffusion coefficients we have measured for anthroylstearate in phosphatidylcholine monolayers ($1.1 < D < 13 \times 10^{-6}$ cm^2/s), similar to values reported for cholesterol monolayers ($0.1 < D < 1 \times 10^{-6}$ cm^2/s) [10], differ by about two orders of magnitude from those reported in the literature for various probes embedded in multilayer systems of the same lipid ($1 < D < 6 \times 10^{-8}$ cm^2/s) [5]. Such differences between monolayer and multilayer systems could be explained by considering that in a bilayer each monolayer is slipping with respect to the other. Each leaflet have a drag effect on the other which brings about a slowing down of the translational diffusion of the molecules. Such an effect has been considered in recent theoretical calculations on brownian motions in membranes [21].

REFERENCES

1. Edidin, M. (1974) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 3*, 179–201.
2. Devaux, P. & McConnell, H. M. (1972) *J. Am. Chem. Soc. 94*, 4475–4481.
3. Lindblom, G., Wennerström, H., Arvidson, G. & Lindman, B. (1976) *Biophys. J. 16*, 1287–1295.
4. Galla, H. J. & Sackmann, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta, 339*, 103–115.
5. McGrath, A. E., Morgan, C. G. & Radda, G. K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta, 426*, 173–185.
6. Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. (1976) *Biophys. J. 16*, 1055–1069.
7. Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. (1976) *Biophys. J. 16*, 1315–1329.
8. Scandella, C. J., Devaux, P. & McConnell, M. H. (1972) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 69*, 2056–2060.
9. Vanderkooi, J. M. & Callis, J. B. (1974) *Biochemistry, 13*, 4000–4006.
10. Stroeve, P. & Miller, I. (1975) *Biochim. Biophys. Acta, 401*, 157–167.
11. Teissie, J., Tocanne, J. F. & Baudras, A. (1976) *FEBS Lett. 70*, 123–126.
12. Tocanne, J. F., Verheij, H. M., Op den Kamp, J. A. F. & Van Deenen, L. L. M. (1974) *Chem. Phys. Lipids, 13*, 389–403.
13. Lalande, R. & Calas, R. (1960) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 144–147.
14. Greene, F. D., Misrock, S. L. & Wolfe, J. R. (1955) *J. Am. Chem. Soc. 77*, 3852–3855.
15. Waggoner, A. S. & Stryer, L. (1970) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 67*, 579–589.
16. Cadenhead, D. A., Kellner, B. M. J. & Muller Landau, F. (1975) *Biochim. Biophys. Acta, 382*, 253–259.
17. Peters, R., Peters, J., Tews, K. H. & Bähr, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta, 367*, 282–294.
18. Denis Papin, M. & Kaufmann, A. (1950) *Cours de Calcul Opérationnel*, Albin Michel, Paris.
19. Gröber, H., Erk, S. & Grigull, U. (1963) *Grundgesetze der Wärmeübertragung*, Springer Verlag, Berlin.
20. *Handbook of Chemistry and Physics* (1967) The Chemical Rubber Co., Cleveland, U.S.A.
21. Saffman, P. G. & Delbrück, M. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 72*, 3111–3113.
22. Tocanne, J. F., Ververgaert, P. H. J. Th., Verkleij, A. J. & Van Deenen, L. L. M. (1974) *Chem. Phys. Lipids, 12*, 201–219.
23. Sacré, M. M. & Tocanne, J. F. (1977) *Chem. Phys. Lipids, 18*, 334–354.
24. Vanderkooi, J., Erecinska, M. & Chance, B. (1973) *Arch. Biochem. Biophys. 154*, 219–229.
25. Cadenhead, D. A. & Müller-Landau, F. (1976) *Biochim. Biophys. Acta, 443*, 10–18.
26. Verkleij, A. J., De Kruyff, B., Ververgaert, P. H. J. Th., Tocanne, J. F. & Van Deenen, L. L. M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta, 339*, 432–437.
27. Ververgaert, P. H. J. Th., De Kruyff, B., Verkleij, A. J., Tocanne, J. F. & Van Deenen, L. L. M. (1975) *Chem. Phys. Lipids, 14*, 97–101.
28. Van Dijck, P. W. M., Ververgaert, P. H. J. Th., Verkleij, A. J., Van Deenen, L. L. M. & De Gier, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta, 406*, 465–478.
29. Singer, S. J. & Nicholson, G. L. (1972) *Science (Wash. D.C.) 175*, 720.
30. Horn, L. W. & Gershfeld, N. L. (1977) *Biophys. J. 18*, 301–309.

J. Teissie, J.-F. Tocanne, and A. Baudras,
Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S.,
118 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse-Cedex, France

CONCLUSION

L'utilisation de la dansylphosphatidylethanolamine comme marqueur permet une étude du comportement de la tête polaire du phospholipide hôte, ici la phosphatidylcholine. L'emploi du système des couches monomoléculaires démontre la puissance de ce modèle liée à deux raisons essentielles :

- possibilité de contrôle de l'aire par molécule
- géométrie plane, donc, à symétrie axiale.

L'étude, en statique, des phénomènes associés à la "transition de phase" démontre que ce processus n'induit pas de réorganisation drastisque de la zone glycérol, zone où est localisé notre indicateur. Par contre, l'existence d'une organisation plus compacte et mieux structurée apparaît à l'évidence lorsque la monocouche est amenée par compression à l'état gel. Cette conclusion est confirmée par l'ensemble de nos expériences concernant la fixation de l'anilinonaphtalenesulfonate (ANS). Alors que lorsque la phosphatidylcholine est à l'état liquide expansé, cet amphiphile peut se fixer en pénétrant dans le réseau des têtes polaires, une telle association devient impossible lorsque l'état gel du phospholipide hôte est induit par compression. Cette observation confirme le caractère d'entassement serré des phospholipides qui existe à l'état gel. Mais le caractère réellement original de nos observations réside bien plus dans la démonstration de l'absence de réorientation de grande ampleur au niveau des têtes polaires lors de la transition de phase. Une telle conclusion, bien évidemment nouvelle dans le cas des couches monomoléculaires où n'existent pas de techniques appropriées aux études de structures, peut être étendue aux autres systèmes. Tenant compte des observations des autres auteurs relatives à l'organisation des chaînes hydrocarbonées, nous pouvons de plus ajouter qu'aucune réorganisation de grande ampleur ne s'effectue au niveau des têtes polaires.

L'extension de nos mesures de fixation de l'ANS aux systèmes des microvésicules, dispersions et films noirs permet, en corrélant les mesures de fluorescence avec celles sur le système des couches monomoléculaires, d'avoir un accès à la définition des aires moléculaires pour ces divers systèmes. Les mesures effectuées pour des températures auxquelles est associé l'état gel font apparaître dans le cas des microvésicules une asymétrie d'organisation. Le feuillet externe se présente, au niveau des têtes polaires, comme une structure lâche où l'espace entre chaque motif est important. Une telle configuration apparaît comme improbable en ce qui concerne le feuillet interne. Une telle observation conduit à rester très critique dans l'emploi des microvésicules comme modèle de membranes biologiques. Cette asymétrie semble induite par le fort rayon de courbure du système et ne sera donc envisageable que pour les organites cellulaires présentant cette particularité telles les invaginations

mitochondriales.

L'utilisation de couches monomoléculaires montre le rôle critique de la transition de phase dans la modulation du phénomène de diffusion transverse au sein des dipalmitoylphosphatidylcholines étalées en monocouches. Les déplacements latéraux sont bloqués lorsque ce phospholipide passe à l'état gel. Une telle observation sur un système modèle permet d'envisager les conséquences de telles transitions dans les membranes biologiques notamment dans les processus de transfert où le déplacement d'espèces intrinsèques est nécessaire. L'extension de cette méthodologie au cas du phosphatidylglycérol, phospholipide acide, met en évidence le rôle de modulation joué par les ions contenus dans la phase aqueuse. Ces résultats doivent être considérés comme un argument pour l'hypothèse de la fonction de médiateurs secondaires du métabolisme postulée au sujet des ions (1).

L'étude dynamique de la transition de phase de la dipalmitoylphosphatidylcholine obtenue par des mesures de fluorescence de la relaxation thermique de dispersions lipidiques marquées par la dansylphosphatidyléthanolamine permet de différencier le comportement de la zone glycérol de celui de l'ensemble de l'assemblage tel qu'il est indiqué par les mesures de turbidimétrie. Nos mesures indiquent un rôle privilégié dans le déclenchement du processus de "fusion" joué par la région marquée par la sonde. Il convient de garder à l'esprit le rôle perturbant que joue ce groupe rapporteur dans notre processus. Un tel effet apparaît dans le déplacement de la température de transition comme décrit par d'autres auteurs (122, 125), déplacement que nous observons aussi bien dans nos mesures en statique (à température fixe) que dans celles par perturbation de l'équilibre (relaxation thermique). Cet effet est classiquement celui des perturbants et constitue l'une des limites de notre méthodologie, celle de la méthode des groupes rapporteurs. Néanmoins, le fait que la courbe de compression des couches monomoléculaires ne soit pas affectée par la présence de la sonde dans nos conditions expérimentales prouve le caractère limité de la perturbation induite. L'intérêt de nos expériences réside dans le caractère différencié de l'information obtenue. Cela confirme notre hypothèse de travail que l'utilisation de modes de détection différents permet de révéler spécifiquement certaines composantes des remaniements structuraux.

L'utilisation de mesures de fluorescence sur des couches monomoléculaires s'avère un outil fructueux pour l'étude structurale et dynamique des modèles de membranes. Nous pensons avoir fourni un apport positif sur le plan de l'utilisation de cette méthode. L'utilisation de marqueurs spécifiquement

localisés au sein de l'édifice permettra de différencier les comportements le long de l'édifice lipidique.

Le développement de cette méthode se trouve aussi dans un raffinement du système modèle par l'utilisation de mélange de lipides et par l'extension vers des systèmes intégrés lipo-protéiques. La seconde partie de notre travail est consacrée à cet aspect dans le cas des interactions du cytochrome c avec des membranes modèles.

ETUDE DE L'INTERACTION DU CYTOCHROME c ET DE MEMBRANES MODELES.

Divers complexes reconstitués entre lipides et cytochrome c ont été décrits (66, 161-174). Les complexes formés apparaissent tous dus à des interactions électrostatiques et peuvent être dissociés par des effets de force ionique (157, 161-167). Mais ces observations ne concernent qu'un effet global et ne fournissent pas d'informations sur les processus qui se déroulent au niveau moléculaire. L'utilisation de molécules de cytochrome c marquées chimiquement par des groupes à électrons célibataires permet de suivre ces interactions par mesure de RPE. Elles révèlent que, pour ces espèces modifiées, une configuration préférentielle du cytochrome c existe lorsqu'il est fixé (162, 158). La confirmation de cette observation dans le cas d'espèces natives est capitale pour la description de la chaîne enzymatique mitochondriale. Le mécanisme de transfert des électrons entre les diverses protéines de la chaîne respiratoire semble dépendre de façon critique de la position relative des plans des hèmes. La démonstration d'une orientation privilégiée de celui du cytochrome c lorsque la protéine est liée à une structure membranaire permettrait une meilleure approche de ces mécanismes de transport dans les systèmes strcuturés. Une telle étude a été réalisée dans le cas de la cytochrome c oxydase par analyse spectrale en lumière polarisée (175).

La fixation du cytochrome c sur des membranes modèles peut être abordée par des mesures de fluorescence. En effet, si des marqueurs fluorescents sont présents dans l'ensemble phospholipidique et si leur spectre d'émission recouvre le spectre d'absorption du cytochrome c, un mécanisme de transfert d'énergie selon Perrin aura lieu lorsque les relations voisinage-orientation seront remplies (voir Introduction). L'inhibition de fluorescence permettra de mesurer la fixation de la protéine (164, 176, 177). De plus, un calcul de simulation permet d'obtenir les termes d'orientation de la protéine liée (Annexe 6).

Cette étude a été menée en utilisant 3 types de modèles de membranes (films noirs, microvésicules, couches monomoléculaires) et à l'aide de deux marqueurs fluorescents dont le positionnement dans l'édifice phospholipidique est sensiblement différent (1-anilino 8-naphtalenesulfonate, dansylphosphatidyléthanolamine).

RESUME

Le nombre de molécules d'ANS fixées à des films noirs de PC et de PI a été calculé. Les conséquences de la fixation de protéines basiques sur l'émission du marqueur inséré dans le film ont été étudiées. Le cytochrome c provoque une diminution alors que le lysozyme et la protamine induisent une augmentation lorsque ces protéines se fixent sur la même face du film noir que le marqueur. Une augmentation de la force ionique supprime cet effet dans le cas du cytochrome c et du lysozyme, un effet résiduel subsistant en présence de protamine. L'état de polarisation de la fluorescence de l'ANS lié n'est pas affecté de façon notable par la fixation de ces protéines. Ces résultats sont interprétés en termes de fixation des protéines au film noir. L'emploi des différents marqueurs fluorescents pour ce type d'étude est analysé de manière comparative.

The Use of Fluorescent Probes for Studying the Interaction of Proteins with Black Lipid Membranes

W. G. Pohl and J. Teissié *

Fachbereich Biologie, Universität Konstanz

(Z. Naturforsch. **30 c**, 147–151 [1975]; received December 10, 1974)

Black Lipid Membranes (BLM), Fluorescent Probes, Protein Binding

The number of 1-anilino-8-naphthalene sulphonate (ANS) molecules bound to black phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylinositol (PI)-membranes was calculated. The fluorescence change of membrane-bound ANS was measured after the addition of positively charged proteins to the same side as ANS. Cytochrome c caused a fluorescence decrease, lysozyme and protamine an increase. These effects were completely reversible in the case of cytochrome c and lysozyme and only partly reversible in the case of protamine by increasing the ionic strength. The fluorescence polarization of membrane bound ANS was not significantly changed by protein addition. The results are discussed with respect to the binding of proteins to black lipid membranes and the use of ANS as a probe compared with other fluorescent probes.

Introduction

The lipid bilayer is accepted as a very important structural feature of most biological membranes. Therefore optical black lipid membranes [1] (BLM) are widely used as models for biological membranes. The importance of proteins for the function of biomembranes prompted much effort to incorporate proteins into black lipid membranes. A direct method to quantitate incorporation is necessary for such studies. Electrical measurements are most sensitive but not applicable in many cases. Spectroscopic methods on the other hand will be applicable in most cases. Proteins carrying groups with a high molar extinction coefficient can directly be monitored by absorption spectroscopy [2]. Another approach is to incorporate or adsorb fluorescent labels into the lipid phase which change their fluorescent properties when proteins interact with the membrane. In the present study we have used the fluorescence method because it is more sensitive than absorption measurements at comparable experimental sophistication and examined how useful it is for studying the interaction between proteins and black lipid membranes. ANS has been chosen as fluorescent probe because its properties are well known [3–5]. As model compounds cytochrome c, lysozyme and protamine were used because they induce only small changes of ANS fluorescence in the aqueous phase. Experiments with another fluorescent probe Dansyl-phosphatidyl-ethanolamine (Dansyl PE) [6–8] have been started. The results [9] fit well into the picture obtained with ANS.

Materials and Methods

Oxidized cytochrome c (Horse heart, Type III) was obtained from Sigma, protamine sulfate (Clupein) pract. from Fluka or Merck, egg white lysozyme cryst. from Boehringer and all used without further purification. 1-anilino-8-naphthalene sulphonate was obtained from Eastman or Serva, Heidelberg, and twice recrystallized from water as the Mg-salt in the dark. Dierucoylphosphatidylcholine (di-22:1-PC, synthesized by K. Janko in our laboratory) and Phosphatidylinositol (bovine brain, Folch Fr. 1, lyoph) from Koch-Light were used for membrane formation. All other chemicals were reagent grade from Merck and Fluka. Water was bidistilled, either unbuffered (pH between 5.3 to 6.3) or buffered with phosphate at pH 6.3. Buffer was usually added after formation of the membranes. Ionic strength was varied between 1 mM and 100 mM with KCl. Fluorescence emission spectra of solutions were recorded with a FICA 55 fluorimeter, fluorescence polarization of solutions with a Doignon-Magot PF-1 apparatus.

Fluorescence spectra and fluorescence polarization of black lipid membranes were measured in an instrument of our own design, which has been described [10, 11] previously. An OSRAM XBO 150 W/1 xenon-high pressure lamp or a 250 W halogen-

Requests for reprints should be sent to Dr. W. G. Pohl, Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, *D-7750 Konstanz*, Postfach 7733.

* Permanent address: Dr. J. Teissié CNRS, Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires, *31077 Toulouse* (France).

wolfram lamp were light sources for excitation. Various glass and interference filters from Schott-Mainz were used to select wavelength for excitation and emission. HNP'B-linear polarizers from Polaroid were used for polarization measurements.

The membranes were formed over a rectangular hole of approx. 1 cm^2 area in a black teflon support. The membrane forming solution contained 2.5 mg phospholipid per ml solvent (a mixture of 10 vol *n*-decane and 1 vol *n*-butanol). Temperature in the cell was 25 ± 2 °C.

Results

1. ANS-fluorescence in solution

To make sure that the observed effects are due to the interaction of ANS and protein with the black lipid membrane we first studied fluorescence changes after adding proteins to an aqueous ANS solution. The effects are always much smaller than those observed with the membrane system at comparable concentrations of salt, ANS and protein.

The fluorescence of ANS solutions was partially quenched on adding cytochrome c. This small quenching could be explained as an inner filter effect of cytochrome c. No effect of the ionic strength on the fluorescence quenching was found. The polarization of the ANS fluorescence was the same with and without protein. For solutions of protein and probe at the concentrations used in the membrane experiments the total quenching (due to the inner filter effect) was about 1%.

Addition of lysozyme to an aqueous ANS solution results only in a small enhancement of fluorescence [4]. A linear increase of the intensity of fluorescence with the concentration of lysozyme (up to 10^{-4} M) was observed. A solution of lysozyme and ANS at the concentrations used in the membrane experiments gave a fluorescence enhancement below 1%.

A small enhancement of the ANS fluorescence around 480 nm was seen after adding protamine sulfate. The effect increased linearly up to a protein concentration of 1.5 mg/ml at constant ANS concentration 4×10^{-5} M. At identical salt and ANS concentrations protamine addition enhanced the ANS fluorescence by maximally 10% in the absence of a membrane while the enhancement was by a factor of 2 to 3 in the presence of a membrane.

2. ANS fluorescence in black lipid membranes

In Fig. 1 the time course of fluorescence is plotted for typical experiments. At time zero the straylight of the aqueous phase was measured. At point 1 a lamella of about 1 cm^2 area was formed on the aper-

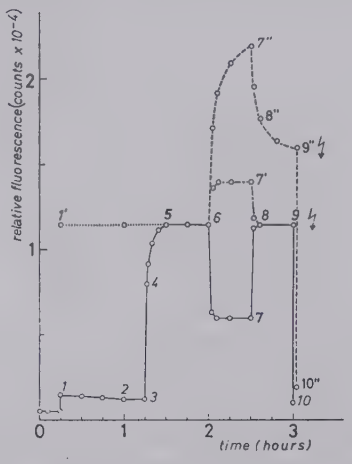


Fig. 1. Fluorescence of ANS bound to black lecithin membranes. (For a more detailed description see text.) Excitation at 365 nm, emission measured at 477 nm. Aqueous phase 10^{-3} M KCl or phosphate buffer, pH 6.3. At point 3 ANS was added to a concentration of 1×10^{-5} M. At point 6 different proteins were added in separate experiments. Full line (point 6 to 7) after addition of 2×10^{-7} M cytochrome c. Line between points 6 and 7′ after addition of 1×10^{-7} M lysozyme. Broken line (point 6 to 7″) after addition of 1×10^{-7} M protamine. At points 7,7′ and 7″ the ionic strength was increased from 1 mM to 50 mM with KCl. (Fluorescence of ANS in the aqueous phase was subtracted in all measurements.) ↯ marks destruction of membranes.

ture. Straylight increased by a factor of 2 to 3. Between points 1 and 2 the lamella turned into the final black state with a small decrease in stray light. At point 3 a solution of 10^{-2} M ANS in ethanol (between 1 μl and 60 μl) was added to the aqueous phase (between 10 and 20 ml) on the backward side of the membrane only. Stirring and fluorescence measurements were started. Point 4 was the first measured after addition of ANS, point 5 was the final value reached after about 15 min. The emission maximum of membrane bound ANS lies between 477 and 505 nm after correcting for filter transmission and photomultiplier sensitivity. Most measurements were done at 477 nm. If ANS was added to the thick lamella (point 1′) fluorescence followed the pointed line and reached the same point 5 when the membrane was in the black state. Fluorescence stayed now constant for extended time. At point 6

the proteins were added under stirring to the same side where ANS was present (separate experiments for each protein). Addition of cytochrome c (oxidised or reduced form) resulted in a fluorescence decrease (points 6 → 7), addition of lysozyme in a small increase (points 6 → 7′), addition of protamine in a big fluorescence increase (points 6 → 7″). If the aqueous phase was 100 mM in KCl instead of 1 mM, no effects were observed in the case of cytochrome c and lysozyme and a small fluorescence increase in the case of protamine. If proteins and ANS were added on different sides of the membrane no fluorescence change occurred. At points 7, 7′ and 7″ the ionic strength of the aqueous phase was increased to 50 mM by adding small amounts of saturated KCl solution under stirring. The fluorescence returned to the original value in the case of cytochrome c and lysozyme (points 8, 9). The effect of protamine was not completely reversed (points 8″, 9″). Finally 10 V were applied across the membranes *via* two silver-silverchloride-electrodes, in order to destroy the membranes (marked by ↯). The fluorescence dropped to a low value (points 10, 10″). Since ANS had only been added to one side, mixing of the two compartments led to variable values of the aqueous phase fluorescence [12]. This was circumvented by a second set of experiments where the two compartments were separated by a 0.2 mm thick glass plate instead of the membrane. ANS was then added on one side only and the aqueous phase fluorescence could be measured accurately.

In Fig. 2 the fluorescence of membrane bound ANS is plotted against the ANS concentration in the aqueous phase in the absence (full line) and presence of constant concentrations of the three proteins. Increasing cytochrome c and lysozyme concentrations to 4×10^{-7} M did not increase the effects shown in Fig. 2. In the case of protamine higher concentrations increased the fluorescence further, but the membranes became unstable. The final fluorescence values were reached within 5 min after increasing the cytochrome or lysozyme concentrations from zero to 2×10^{-7} M or above; they were reached within 15 min after increasing the concentrations from zero to 1×10^{-7} M. In the case of protamine no steady values were reached within 30 min.

The same results were obtained when the pH was set to 6.3 with 1 mM phosphate buffer or to 5.1 with 1 mM citrate buffer.

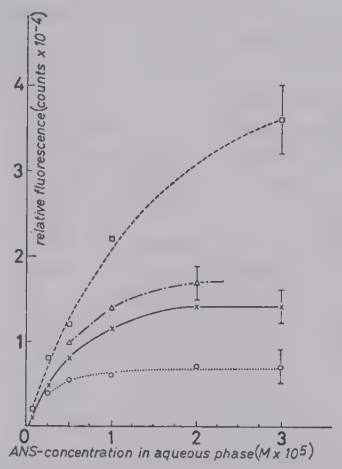


Fig. 2. Fluorescence of ANS bound to black lecithin membranes versus ANS concentration in the aqueous phase (measuring conditions as in Fig. 1). ×—×, without protein; ○···○, with 2×10^{-7} M cytochrome c; △–·–·–△, with 1×10^{-7} M lysozyme; □— —□, with 1×10^{-7} M protamine. Measurements were done 20 min after adding the proteins. The bars on the right side of the curves indicate the mean error for eight experiments.

No change of the membrane conductivity ($\lambda \sim 10^{-8}\,\Omega^{-1}\,\mathrm{cm}^{-2}$) was found after adding cytochrome c and lysozyme. Addition of 1×10^{-7} M protamine increased the conductivity at least by a factor of 3.

The fluorescence polarization (excitation with horizontally polarized light) of ANS bound to membranes was 0.20 ± 0.05. No significant changes were observed after adding proteins.

No significant fluorescence differences between PC- and PI-membranes were found at equal ANS concentrations.

Dansyl-PE was incorporated into PC- and PI-membranes (molar ratio of label to lipid 1:3 in both film-forming solutions). With both lipids the BLM showed the same fluorescence (excitation at 330 nm, emission measured at 505 nm). Addition of 10^{-7} M cytochrome c gave 10 times stronger quenching in the case of PI-membranes than in the case of PC-membranes.

Discussion

The interaction of cytochrome c with lipid dispersions and membrane vesicles has repeatedly been studied, *e. g.* [13–15]. The use of black lipid membranes (BLM) is advantageous because one can easily add substances to both sides of the membrane or apply

a potential difference across the membrane. Yguerabide [16] has suggested the use of hanging spherical membranes for such studies. A further advantage of the BLM method is, that one can measure the fluorescence polarization of an oriented membrane and calculate the orientation of pigment molecules in this membrane [11, 16].

The ANS fluorescence in BLM in the absence of proteins has already been studied with egg phosphatidylcholine and glycerolmonooleate [5]. The results with dierucoylphosphatidylcholine are similar. The fluorescence of a thick film in the presence of ANS was nearly the same as that of the BLM (Fig. 1, points 1′ and 5) in contrast to films containing chlorophyll [17]. This is a good evidence that ANS is always located at the membrane-water interface and not in the hydrocarbon layer. The number of ANS molecules per unit area of the membrane can be calculated by comparing the fluorescence of an aqueous volume of known geometry and ANS concentration with the fluorescence of the illuminated membrane area. Using the quantum yield of 0.004 for ANS in water [4] and 0.20 for ANS in the membrane [5] we obtained $[ANS]_{membrane} = (3 \pm 1) \times 10^{13}$ molecules ANS per cm^2 at the aqueous concentration $[ANS]_{water} = 1.5 \times 10^{-5}$ M and $[ANS]_{membrane} = (4 \pm 2) \times 10^{12}$ molecules ANS per cm^2 at the aqueous concentration $[ANS]_{water} = 2 \times 10^{-6}$ M. A binding constant $K = \frac{[ANS]_{membrane}}{[ANS]_{water}} = (3 \pm 2) \times 10^{-3}$ cm may be calculated.

In our experiments both PC and PI membranes showed the same fluorescence at equal concentrations of ANS in the aqueous phase. This was taken to indicate that membranes from both lipids bind the same number of ANS molecules. However one must keep in mind that the quantum yield of bound ANS may be different for lipids with different polar head groups.

Addition of different proteins to ANS labelled black lipid membranes caused different fluorescence changes (see Figs 1 and 2). By control experiments we excluded that the effects were due to a change of the ANS fluorescence in the aqueous phase. This control is much easier for cytochrome c, lysozyme and protamine than for other proteins (like bovine serum albumin [18]) that enhance fluorescence in water considerably. It has been shown [2] that PI-membranes electrostatically bind a monolayer with 10^{13} cytochrome c molecules per cm^2 and PC-membranes bind at least 20 times less cytochrome c. The present study gives evidence that the same number of ANS molecules is bound to PI- and PC-membranes as discussed above. In both types of membranes half of the ANS fluorescence was quenched maximally by cytochrome c addition at $ANS_{water} = 3 \times 10^{-5}$ M. At $ANS_{water} = 3 \times 10^{-6}$ M cytochrome c did still quench half of the ANS fluorescence in PI-membranes but only 20% of the ANS fluorescence in PC-membranes. Our interpretation of these findings is that at high ANS-concentrations sufficient negative charges are introduced into PC-membranes to bind a monolayer of cytochrome c. At low ANS-concentrations considerably less cytochrome c is bound. This interpretation is supported by experiments with Dansyl-PE [9] in BLM and with 12-(9-anthroyl) stearic acid [14] in lipid dispersions. In both cases strong quenching by cytochrome c was found in the presence of negatively charged lipids (like PI or cardiolipin) and weak quenching when only PC was present. This difference between zwitterionic and negative lipids is also observed at low ANS concentrations but not at high ANS concentrations as described above. The ANS concentration obviously affects the interaction between the lipid membrane and proteins. This is a disadvantage of ANS in addition to the well known facts that it is difficult to decide whether it binds to the lipid or to the protein portion of membranes [3] and its relatively high solubility in water [12]. Similar effects are expected with other charged and water soluble fluorescence markers. Lipid soluble probes or fluorescence-labelled lipids are more reliable for this reason.

Concerning the quenching mechanism, we believe that energy transfer to the nonfluorescent porphyrin ring of cytochrome c occurs, as has been suggested in similar cases [14, 15]. The alternative interpretation that the number of membrane bound ANS molecules changes is unlikely for various reasons. Increasing the cytochrome c concentration above 2×10^{-7} M did not change the fluorescence further. The fluorescence changes during adsorption and desorption of cytochrome c were faster than after adding ANS (see Fig. 1). Lysozyme which is similar in size, shape and charge should be equally bound by negatively charged membranes. No quenching of ANS fluorescence is possible because it does not carry a group absorbing in the visible spectral range. The slight fluorescence increase in the presence of lysozyme may be due to a small polarity change in the

surrounding of bound ANS. The big fluorescence increase after addition of protamine obviously has other reasons. This highly positively charged molecule interacts more strongly with the BLM. Increased ionic strength does not inhibit the interaction completely. The conductivity of the membrane is increased by a factor of 3 or more. If Dansyl-PE was used as a probe, protamine addition did not change the fluorescence. The most likely explanation of the fluorescence increase after adding protamine and ANS to a BLM is binding of additional ANS molecules to the membrane.

The polarization measurements show that ANS mobility and (or) orientation in the lipid membrane are not significantly changed during adsorption of cytochrome c, lysozyme and protamine.

To summarize the main points this study shows that ANS can be used as a probe for binding of proteins to black lipid membranes. The fluorescence of membrane-bound ANS is changed qualitatively similar as fluorescence of ANS in water by addition of three different proteins, but the effects are strongly enhanced. ANS contentrations in water above 3×10^{-6} M can affect the interaction between proteins and lipid membranes which is a disadvantage of this probe.

One of us (J. T.) thanks Prof. Dr. P. Läuger for the possibility to visit his laboratory and the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) for financial support which made this visit possible.

Thanks are due to Mr. K. Janko for the synthesis of Dansyl-phosphatidyl-ethanolamin.

The work has been financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 138).

[1] P. Mueller, D. O. Rudin, H. TiTien, and W. C. Wescott, Nature **194**, 979–980 [1962].
[2] A. Steinemann and P. Läuger, J. Membr. Biol. **4**, 74–86 [1971].
[3] G. K. Radda and J. Vanderkooi, Biochim. Biophys. Acta **265**, 509–549 [1972].
[4] L. Stryer, J. Mol. Biol. **13**, 482–495 [1965].
[5] H. P. Zingsheim and D. A. Haydon, Biochim. Biophys. Acta **298**, 755–768 [1973].
[6] E. Shechter, T. Gulic-Krzywicki, R. Azerad, and C. Gros, Biochim. Biophys. Acta **241**, 431–442 [1971].
[7] J. Yguerabide and L. Stryer, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **68**, 1217–1221 [1971].
[8] E. J. A. Lea and T. Gulik-Krzywicki, Nature New Biology **237**, 95–96 [1972].
[9] G. W. Pohl, to be published.
[10] G. W. Pohl, G. Stark, and H. W. Trissl, Biochim. Biophys. Acta **318**, 478–481 [1973].
[11] G. W. Pohl, Biochim. Biophys. Acta **288**, 248–253 [1972].
[12] F. Conti and F. Malerba, Biophysik **8**, 326–332 [1972].
[13] A. Azzi, S. Fleischer, and B. Chance, Biochem. Biophys. Res. Commun. **36**, 322–327 [1969].
[14] J. Vanderkooi, M. Erecinska, and B. Chance, Arch. Biochem. Biophys. **154**, 219–229 [1973].
[15] L. S. Kaminsky, J. J. Henderson, and K. M. Ivanetich, Biochem. Biophys. Res. Commun. **51**, 40–45 [1973].
[16] J. Yguerabide, Fluorescence Techniques in Cell Biology (A. A. Thaer and M. Sernetz, eds.), p. 367–379, Springer 1973.
[17] A. Steinemann, N. Alamuti, W. Brodmann, O. Marschall, and P. Läuger, J. Membr. Biology **4**, 284–294 [1971].
[18] E. Smekal, Hie Ping Ting, L. G. Augenstein, and H. TiTien, Science **168**, 1108–1109 [1970].

BIOCHIMIE, 1977, n° 59, 693-703.

A fluorescence study of the binding of cytochrome *C* to mixed-phospholipid microvesicles : evidence for a preferred orientation of the bound protein.

Justin TEISSIÉ and Alain BAUDRAS ◇.
Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires du C.N.R.S., 118, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex.

(25-3-1977).

Summary. — Kinetic and equilibrium experiments are reported on the binding of the fluorescent probe 1,8-anilino-naphtalene sulfonate (ANS) to microvesicles of natural lecithin containing 10 per cent of an anionic phospholipid (90 : 10 mixtures). Kinetics discriminated between fast binding to the outer leaflet of the bilayer and apparently slow binding to the inner leaflet controlled by the diffusion of the probe across the bilayer. The equilibrium distribution of ANS between the two leaflets was not dependent on the nature of the anionic species and the spectral properties of bound ANS were identical in all cases investigated. A hyperbolic saturation was observed allowing to propose an affinity scale for the binding of ANS to mixtures of lecithin with phosphatidic acid, phosphatidylinositol, and cardiolipin. The effects on binding of ionic strength and sodium dodecylsulfate were also considered.

The binding of horse heart ferricytochrome *c* to ANS-labelled microvesicles was studied quantitatively making use of the quenching of the probes fluorescence by the heme. Perrin-Förster energy transfer could be analysed on the basis of a simple model of the physical arrangement of the system which was elaborated from published data referring to ANS and cytochrome *c* binding to phospholipids. Experimental and theoretical computed values of the quenching efficiency were compared and led to conclude in favor of a preferred orientation of the heme crevice fully accessible from the external space at the lipid interface.

Fluorescence has proved to be a powerful tool in the study of biological membranes [1-5]. Large variations of fluorescence are often encountered with various probes upon changes in structure, fluidity, and/or on binding ligands of any size to membranes or to membrane models. In cases where Perrin-Förster energy transfer do occur between a fluorescent probe and a chromophoric group of the ligand, not only the binding parameters but also the orientation factors can be accessible. However, proper use of such a method depends on the availability of well defined systems, particularly with respect to the geometric disposition of the donor and acceptor molecules.

In the multi-cytochrome chain of mitochondria, orientation factors for the hemes relative to each other and to the membrane are generally accepted to be critical for efficient electron transfer. Some results were already published which dealt with the binding of cytochrome *c* to mitochondrial and model membranes making use of fluorescent probes, but no clear-cut evidence could be given of any preferred orientation of the bound cytochrome *c* molecule [6, 7]. Information can be deduced on such a problem from the analysis of Perrin-Förster energy transfer on binding cytochrome *c* to ANS-labelled microvesicles of phospholipids. The reasons for this choice were the following :

1 — the location of the heme (the quencher) within the cytochrome *c* molecule is known accurately from X-ray crystallography [8].

2 — the position of the probe when inserted in lipid membranes is well defined [9], and its fluorescence properties in various environments and model systems are well documented [10, 11].

3 — a good overlap exists between the emission spectrum of the probe (ANS) and the absorption spectrum of the acceptor chromophore (heme). Furthermore, microvesicles are easily prepared from mixtures of phospholipids which can simulate the composition of mitochondria.

Abbreviations.

ANS : 1,8-anilino-naphtalene sulfonate ; SDS : Sodium dodecyl sulfate ; DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine ; DMPC : Dimyristoyl phosphatidylcholine ; PA : Phosphatidic acid ; PI : Phosphatidyl inositol ; CL : Cardiolipin ; CMC : Critical micellar concentration.

◇ To whom all correspondence should be addressed.

In the present paper, we will first describe the binding properties and interaction of ANS with microvesicles of various compositions in different conditions of ionic strength and in the presence of a surfactant (SDS). Afterwards, we will proceed to the analysis of the binding of cytochrome *c* to ANS-labelled microvesicles with a composition similar to that of yeast mitochondria. The quenching efficiency determined experimentally under conditions where cytochrome *c* does form a monolayer at the surface of the vesicles will be compared to theoretical values computed from a model in which the orientation of the protein is the major variable. Details on the model, computing procedure, and program will be given in the form of an Appendix.

MATERIALS AND METHODS.

Chemicals.

Phosphatidylcholine was prepared from egg yolk following the procedure of Pangborn [12] and phosphatidic acid according to Papahadjopoulos [13] ; both were kindly supplied by Dr. G. Lanéelle of this Institute. Cardiolipin (C 3760) was purchased from Sigma and phosphatidylinositol (4661 d) from Koch-Light. All these compounds were checked for purity by thin layer chromatography. The magnesium salt of 1,8-anilinonaphtalene sulfonate (Kodak) was recrystallized from water after a filtration through activated charcoal. Sodium dodecyl sulfate used was Sipon LS100 from Sinnova.

Salts (Normapur grade from Prolabo) were always dissolved in quartz double distilled deionized water, and buffers or salts solutions were filtered through Millipore filters (0.22 µm pore size) to remove any particles.

Cytochrome *c*.

Horse heart Type III ferricytochrome *c* from Sigma was used without any further purification. Ferrocytochrome *c* was prepared by an enzymatic reduction (L-lactate + yeast L-lactate cytochrome *c* reductase) followed by a filtration through a column of Sephadex G25 (Pharmacia) [14].

Microvesicles (sonicated liposomes).

Pure solutions or mixtures of phospholipids were made up in chloroform or in ethanol (Spectroscopic grade) by weighing the proper amount of the lipid. The required volume of solution was deposited in a vial suited for subsequent sonication, and the solvent was evaporated under a stream of nitrogen gas. The buffer was then added and the solid first dispersed by hand shaking, then by use of a Vortex until a uniform turbid liposome suspension was obtained. Sonication (Branson Model J1 sonifier equipped with the « microtip » and model J22 Power Supply ; operation at position 20) consisted of repeated cycles of 15 sec. operation followed by 15 sec. cooling (vial kept in an ice bath during treatment) until suspension became clear which indicated that microvesicles were formed. The number of cycles to be applied depended on the nature of the lipid used (6 to 10 in our case). Metal particles from the probe and residual multi-lamellar liposomes were centrifuged out in a Spinco Model 50 operated for 10 min. at 100,000 × g, at 4°C. When stored under nitrogen in the refrigerator (4°C) such stock suspensions of microvesicles were stable for 48 hours [15].

Fluorescence.

Fluorescence measurements were made with the Fica Model 55 spectrophotofluorimeter (corrected) working at a resolution of 7.5 nm, and coupled with a chart recorder ; the temperature of the cell was kept constant at 20.0 ± 0.1°C (Haake Model FK circulating bath).

Polarization of the emitted light was measured with the Doignon-Magot Model PF1 fluorescence-polarization meter.

Fluorescence life-time experimentation was conducted with the apparatus devised at the Laboratoire de Physicochimie Structurale et Macromoléculaire, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, (E.S.P.C.I.), Paris [16]. Experimental results were either computed at the Centre de Calcul, E.S.P.C.I., or by our own, using a Wang 2200 electronic calculator coupled to a Texas Model ASR unit.

RESULTS.

Dynamic and static investigation of the binding of ANS to microvesicles : a fluorescence study.

Illumination (λ_{exc} = 360 nm) of a phospholipid microvesicles suspension in the presence of the fluorescent probe ANS resulted in an observed signal (λ_{em} = 480 nm) which originates from three different effects : the emission of free dissolved

ANS, the emission of ANS bound of the bilayer structure, and scattered light which may not be negligible since microvesicles are efficient scattering centers. However, in aqueous solutions, the fluorescence of free ANS is small due to the very low quantum yield ($\sim$ 0.004) in this medium as compared to much larger values when ANS is inserted in an almost non polar environment (quantum yield $\sim$ 0.2) [10]. Moreover, scattered light is not really troublesome, especially in dynamic fluorescence measurements since its contribution is not time dependent provided that the size of the microvesicles does not change with time.

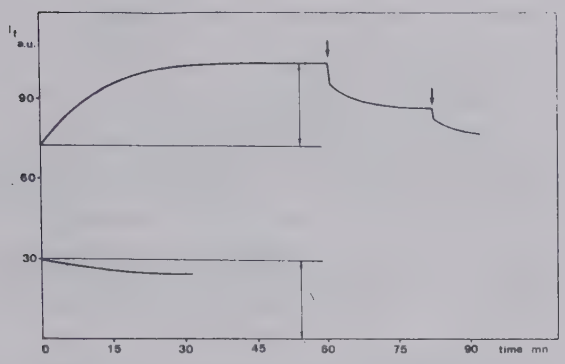


FIG. 1. — *Kinetics of the ANS interaction with microvesicles and effect of SDS.*

The fluorescence intensity (arbitrary units) was recorded as a function of time (minutes) : λ_{exc} = 360 nm ; λ_{em} = 480 nm. Upper curve : unlabelled microvesicles added to a 10 µM ANS solution in 10 mM phosphate buffer pH 7.2.

Lower curve : microvesicles were prelabelled by incubation with the same 10 µM ANS buffered solution prior to dilution in probe-free buffer. In both cases, the vesicles were prepared from a PC:PA 10:1 mixture and the final concentration in the cuvette (calculated from phosphorus analysis) was 160 µg/ml.

Δ, the amplitude of the slow process in the upper curve is observed to be identical to the initial value of the fluorescence signal in the lower curve.

Arrows indicate two consecutive additions of SDS at final concentrations of 2.5 µM and 5 µM.

After mixing microvesicles with a buffered solution of probe, an enhancement of the fluorescence intensity was observed. Its kinetics showed a fast phase (half-time less than mixing and recorder response time of the order of 10 s.) and a much slower one. Such a behaviour will be described below. In our working conditions the intensity of scattered light measured with the vesicles suspension in the absence of probe was in any case only a few percent of the total fluorescence intensity observed.

Emission spectrum of bound ANS.

A spectral shift of the emission of ANS towards shorter wavelength was observed in the presence of microvesicles. This shift was instantaneous and resulted in an emission maximum located at 480 nm. No further spectral shift was observed during the slow phase. This behaviour was observed with any of the phospholipid mixtures used here ; it is typical for ANS which shows a blue shift and an increased quantum yield when inserted in a non polar environment [10, 17, 18]. Any hindrance to solvent cage relaxation should lead to a similar picture.

Experiments with mixtures of PC and CL (PC : CL 10:1) showed that fluorescence life-time (7.2 ns) and polarization ($p_n^{0°} = 0.11$) were neither changed by the ionic strength nor by the presence of a surfactant (SDS).

Time course of fluorescence changes on binding (or dissociating) ANS to (from) phospholipid microvesicles.

In this study, the time dependence of the fluorescence signal was recorded in two kinds of experiments in which the microvesicles were either prepared in buffer alone and subsequently mixed with buffer containing ANS, or, alternatively, the vesicles were prepared in the presence of ANS and thereafter diluted with buffer. In the first case, the enhancement of fluorescence was clearly resolved in a rapid phase (within the time response of the apparatus i.e. 10 s.) and a slow phase which extended over one hour. This behaviour is reminiscent of observations already reported for erythrocyte membranes [19]. When the microvesicles were labelled with ANS prior to their dilution in buffer (second case) the fluorescence signal was observed to decrease slowly from an initial value the magnitude of which is exactly equal to the amplitude of the slow fluorescence change described in the preceding experiment (fig. 1).

Influence of the lipid composition of microvesicles.

In order to approach the natural composition of the mitochondria inner membrane [20], microvesicles were prepared which differed in composition (mixtures of phosphatidylcholine and other phospholipids). Investigations on mixtures showed that the biphasic kinetic behaviour of the fluorescence is observable in any case. Upon variation of the concentration of microvesicles with different composition in the presence of a given

concentration of ANS, the fluorescence signal observed in the first kinetic phase showed a saturation phenomenon. When increasing the proportion of the anionic species (PA), much higher con

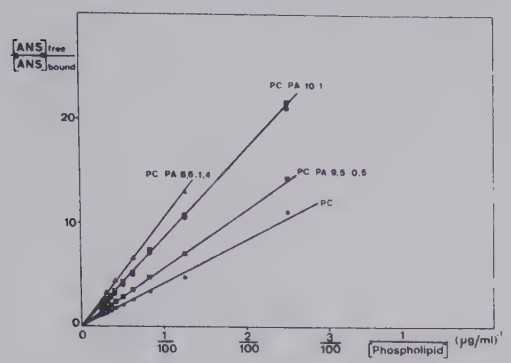


FIG. 2. — *Double reciprocal plot for ANS binding to PC:PA mixed phospholipid microvesicles.*

Microvesicles were prepared from PC:PA mixtures of the indicated composition. ANS concentrations were : (■) 4 µM ; (★) 7 µM ; (●) 14 µM ; (▲) 32 µM ; all in 10 mM phosphate buffer pH 7.2. The ratio ANS_{free}/ANS_{bound} equals $\frac{F\infty - F}{F}$ where F stands for the experimental value of fluorescence intensity and F∞ is the limiting value of F at phospholipid saturation obtained by extrapolation of the primary plots 1/F versus 1/[phospholipid] (not shown).

centrations of microvesicles were nedded for saturation indicating a decreased affinity of the sites. Double reciprocal plots of the ratio $\frac{\text{ANS free}}{\text{ANS bound}}$ versus phospholipid concentration (fig. 2) were linear allowing the calculation of an apparent

TABLE I.

Affinity scale for the binding of ANS to PC and mixed phospholipids microvesicles.

PC	PC : PA 9.5 : 0.5	PC : PA 10 : 1	PC : PA 8.6 : 1.4	PC : CL 10 : 1	PC : PI 10 : 1
2.2	1.8	1.6	0.95	1.0	1.0

Affinity constants are $(g/l)^{-1}$. Standard error : 0.3 $(g/l)^{-1}$. ANS concentration ranging from 1 µM to 30 µM ; 10 mM phosphate buffer pH 7.2.
The compositions indicated are those of the phospholipid mixtures from which the microvesicles were prepared by sonication.

association constant [21, 22] the value of which reflects the relative apparent affinity of a series of phospholipid mixtures for ANS (table I).

Effects of ionic strength and SDS.

Increasing the ionic strength (by adding NaCl) resulted in an enhancement of the fluorescence intensity (up to 100 per cent with 0.1 M NaCl added to the working buffer). No changes were found for the following parameters : emission spectrum, fluorescence lifetime (with PC:CL 10:1 mixtures) and polarization. Double reciprocal plots (1/F *vs* 1/(microvesicles)) did extrapolate to the same value of maximum fluorescence intensity. The affinity for ANS increased on raising the ionic strength and this effect was the larger, the higher the anionic mean charge of the phospholipid mixture. Anionic surface charges may be intrinsic to the lipid mixture (increased PA) or extrinsic such as that originating from the binding of anionic surfactants. For example, addition of SDS is another way which allowed introducing negative charges within the bilayer thus creating more sites for cationic ligands [23]. The intensity of the fluorescence of ANS in the presence of microvesicles decreased when SDS in the micromolar concentration range was added to the suspension (SDS concentration were much smaller than the CMC which is about 1.10^{-3} M) (fig. 1). Neither the emission spectrum nor the fluorescence life-time were affected by the presence of SDS. The ionic strength effect described for a phospholipid mixture with a given composition was further reinforced in the presence of SDS (table II).

TABLE II.

Effect of ionic strength and SDS on the fluorescence intensity of ANS bound to PC:PA mixed phospholipid microvesicles.

	PC	PC : PA 9.5 : 0.5	PC : PA 10 : 1
	n. d. (1)	1.5	1.9
+ 5 µM SDS	1.3	1.75	2.1
+ 10 µM SDS	1.45	2.1	2.3

The ratio of the fluorescence intensity in 5 mM Phosphate buffer + 120 mM NaCl to that in 5 mM Phosphate buffer is given. Concentration were : 6.8 µM ANS, 160 µg/ml phospholipids.
(1) Not determined.

INTERACTION OF CYTOCHROME *c* WITH ANS-LABELLED MICROVESICLES OF PHOSPHOLIPIDS.

We have previously shown [6] that no direct binding of ANS to cytochrome *c* does occur in solution. Therefore, it was thought possible to

concentration of ANS, the fluorescence signal observed in the first kinetic phase showed a saturation phenomenon. When increasing the proportion of the anionic species (PA), much higher con

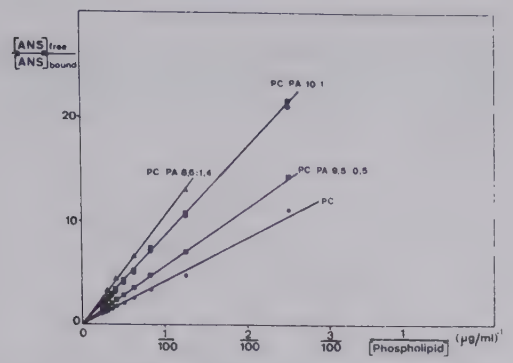


FIG. 2. — *Double reciprocal plot for ANS binding to PC:PA mixed phospholipid microvesicles.*

Microvesicles were prepared from PC:PA mixtures of the indicated composition. ANS concentrations were : (■) 4 µM ; (★) 7 µM ; (●) 14 µM ; (▲) 32 µM ; all in 10 mM phosphate buffer pH 7.2. The ratio ANS_{free}/ANS_{bound} equals $\frac{F\infty - F}{F}$ where F stands for the experimental value of fluorescence intensity and F∞ is the limiting value of F at phospholipid saturation obtained by extrapolation of the primary plots 1/F versus 1/[phospholipid] (not shown).

centrations of microvesicles were nedded for saturation indicating a decreased affinity of the sites. Double reciprocal plots of the ratio $\frac{\text{ANS free}}{\text{ANS bound}}$ versus phospholipid concentration (fig. 2) were linear allowing the calculation of an apparent

TABLE I.

Affinity scale for the binding of ANS to PC and mixed phospholipids microvesicles.

PC	PC : PA 9.5 : 0.5	PC : PA 10 : 1	PC : PA 8.6 : 1.4	PC : CL 10 : 1	PC : PI 10 : 1
2.2	1.8	1.6	0.95	1.0	1.0

Affinity constants are $(g/l)^{-1}$. Standard error : 0.3 $(g/l)^{-1}$. ANS concentration ranging from 1 µM to 30 µM ; 10 mM phosphate buffer pH 7.2.
The compositions indicated are those of the phospholipid mixtures from which the microvesicles were prepared by sonication.

association constant [21, 22] the value of which reflects the relative apparent affinity of a series of phospholipid mixtures for ANS (table I).

Effects of ionic strength and SDS.

Increasing the ionic strength (by adding NaCl) resulted in an enhancement of the fluorescence intensity (up to 100 per cent with 0.1 M NaCl added to the working buffer). No changes were found for the following parameters : emission spectrum, fluorescence lifetime (with PC:CL 10:1 mixtures) and polarization. Double reciprocal plots (1/F *vs* 1/(microvesicles)) did extrapolate to the same value of maximum fluorescence intensity. The affinity for ANS increased on raising the ionic strength and this effect was the larger, the higher the anionic mean charge of the phospholipid mixture. Anionic surface charges may be intrinsic to the lipid mixture (increased PA) or extrinsic such as that originating from the binding of anionic surfactants. For example, addition of SDS is another way which allowed introducing negative charges within the bilayer thus creating more sites for cationic ligands [23]. The intensity of the fluorescence of ANS in the presence of microvesicles decreased when SDS in the micromolar concentration range was added to the suspension (SDS concentration were much smaller than the CMC which is about 1.10^{-3} M) (fig. 1). Neither the emission spectrum nor the fluorescence life-time were affected by the presence of SDS. The ionic strength effect described for a phospholipid mixture with a given composition was further reinforced in the presence of SDS (table II).

TABLE II.

Effect of ionic strength and SDS on the fluorescence intensity of ANS bound to PC:PA mixed phospholipid microvesicles.

	PC	PC : PA 9.5 : 0.5	PC : PA 10 : 1
	n. d. (1)	1.5	1.9
+ 5 µM SDS	1.3	1.75	2.1
+ 10 µM SDS	1.45	2.1	2.3

The ratio of the fluorescence intensity in 5 mM Phosphate buffer + 120 mM NaCl to that in 5 mM Phosphate buffer is given. Concentration were : 6.8 µM ANS, 160 µg/ml phospholipids.
(1) Not determined.

INTERACTION OF CYTOCHROME *c* WITH ANS-LABELLED MICROVESICLES OF PHOSPHOLIPIDS.

We have previously shown [6] that no direct binding of ANS to cytochrome *c* does occur in solution. Therefore, it was thought possible to

use the quenching of the fluorescence of the vesicle bound probe for quantitatively evaluating the binding of the protein (the heme group being the quencher) to microvesicles of phospholipids with different composition.

Binding of cytochrome c to microvesicles.

When ferricytochrome *c* was added to a suspension of microvesicles previously labelled with ANS (several hours incubation time) the intensity of the fluorescence emitted by the probe was reduced (fig. 3). The magnitude of this decrease was larger in low than in high ionic strengh buffer.

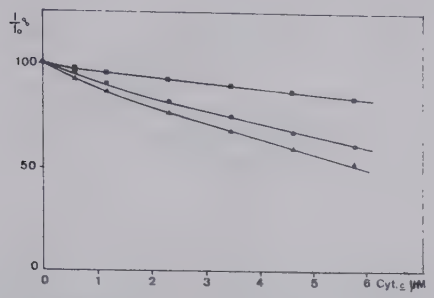


FIG. 3. — *Effect of cytochrome c on the fluorescence of ANS-labelled microvesicles.*

Relative fluorescence intensities observed when increasing concentrations of cytochrome *c* are added to microvesicles prepared from the mixture PC:CL 10:1 (final concentration 160 µg/ml phospholipids) and preincubated with 6.5 µM ANS and 5 µM SDS in 5 mM phosphate buffer pH 7.2 (▲) or in the same buffer supplemented with 0.1 M NaCl (●). The upper curve shown (■) is true quenching at low ionic strength (5 mM buffer) after correction for inner filter effect (see Text). This latter curve was constructed the following way : for each concentration of cytochrome *c* two values of relative fluorescence intensities were measured, the one at low, $y_l = (I/I_o)_l$, the other at high, $y_h = (I/I_o)_h$, ionic strength. The ratio y_l/y_h is the « corrected » value.

At low ionic strength, the amplitude of the quenching effect was not only dependent on the value of the ionic strength, but also on the composition of the microvesicles : the higher the density of negative charges, the larger the quenching observed. ANS itself being anionic, at neutral pH, it contributed to the charge density of the vesicles. Furthermore, both ionic strength and composition responses were qualitatively present when different amounts of bound ANS were used. Fluorescence life-time measurements showed that at low ionic strength and in the presence of cytochrome *c*, a new decay is observed with a shorter life-time, in addition to the characteristic life-time of 7.2 ns observed for bound ANS in the absence of the protein. Correction being made for inner filter effect, as discussed below, the size of the true quenching due to Perrin-Förster energy transfer (probe → heme) could be evaluated. It was thus possible to quantify the binding by measuring the magnitude of this quenching and using increasing concentration of cytochrome *c* in the presence of a given amount of labelled microvesicles (fig. 4). Working with microvesicles of various composition, a relative affinity scale could be established (table III). Plots of reciprocal quenching versus reciprocal cytochrome *c* concentration were observed to extrapolate to a unique value of reciprocal maximum quenching ($I/I_o = 0.57 \pm 0.07$) with vesicles of any composition in the series of mixtures investigated. Very

TABLEAU III.

Values of cytochrome c concentrations giving 50 per cent of the maximum quenching effect (probe → heme energy transfer).

	PC : PI 10 : 1	PC : PA 10 : 1	PC : CL 10 : 1
	10	7	3
+10 µM SDS	5	4	2.5

Cytochrome *c* concentrations are µM. 160 µg/ml phospholipids in 5 mM Phosphate buffer pH 7.2 .
Both 6.8 µM and 12 µM ANS concentrations were used for each experimental system.

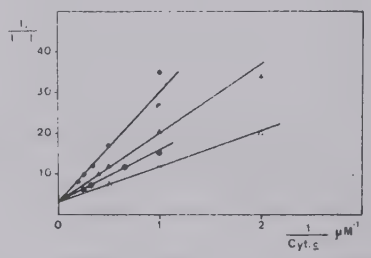


FIG. 4. — *Binding of cytochrome c to ANS-labelled microvesicles of different composition.*

Double reciprocal plot for the binding of cytochrome *c* to microvesicles prepared from mixtures of PC with PA or CL : PC:PA 10:1 (●) ; PC:CL 10:1 (▲) ; PC:PA 10:1, SDS 10 µM (★) ; PC:CL 10:1, SDS 10 µM (Δ). The vesicles (160 µg/ml phospholipids) were preincubated with 6.5 µM ANS in 5 mM phosphate buffer pH 7.2, in the presence or absence of SDS, prior to the addition of cytochrome *c*. I_o is the fluorescence intensity observed in the absence of cytochrome *c*, and I the intensity measured in the presence of the protein and corrected for inner filter effect.

similar results were obtained in the presence of SDS which only elicited a general shift of the relative affinity scale towards higher affinity values (table III and fig. 4). Particularly, microvesicles of pure PC in the presence of SDS now displayed a definite binding capacity.

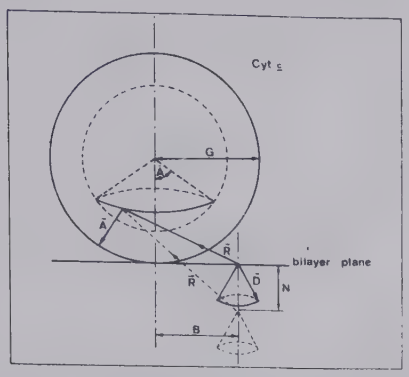


FIG. 5. — *The model for cytochrome c binding.*
Schematic representation of the relative disposition of cytochrome *c*, bilayer plane, and ANS emission transition moment.

When the ionic strength was increased, the apparent quenching of a given concentration of cytochrome *c* decreased and reached a constant value when the NaCl concentration became higher than 0,05 M. At high ionic strength (5.10^{-3} M phosphate buffer + 0.1 M NaCl), the measured quenching was strictly independent on the composition of the phospholipid mixtures and on the presence of SDS, and the observed fluorescence intensity decreased exponentially with the concentration of the protein, in agreement with Beer-law. Moreover, a single fluorescence life-time of 7.2 ns was observed (with PC : CL 10:1 mixtures). This apparent quenching at high ionic strength was used to correct for inner filter effect the true quenching observed at low ionic strength (fig. 3 and Discussion).

Evidence for a preferred orientation of cytochrome c *bound to microvesicles.*

The maximum value of quenching observed at low ionic strength when microvesicles were saturated with cytochrome *c* being constant and not dependent on the charge density and nature of the acid phospholipids used, we thought reasonable to interpret the quenching efficiency in terms of orientation parameters of the protein. This was done by simulation with a computer making use of the Perrin-Förster relationship and of a simple model of the physical arrangement of the donor (ANS) and acceptor (cytochrome *c*) molecules in the system (Appendix). Cytochrome *c* was supposed to be arranged in a continuous monolayer at the surface of the microvesicles and a uniform dispersion of both ANS and PA in the PC matrix was assumed.

The parameters used for computation were the angle A for the orientation of the absorption transition moment of the heme of cytochrome *c*, and the distance B separating an ANS molecule from the point of contact of a cytochrome *c* molecule onto the lipid surface which takes values within the limits $B = 0$ and $B = G\sqrt{2}$ (fig. 5 and Appendix). A third parameter N was introduced to account for possible changes in the degree of burying of the probe within the bilayer ; such a burying was assumed not to change the environment of the probe, hence its quantum yield. The orientation of the emission transition moment of ANS was expected to be identical for microvesicles and multi-layers for which it could be determined [9]. Solutions of the Perrin-Förster equation were selected for parameters A and B (for a set of values of N) which satisfied the afo-

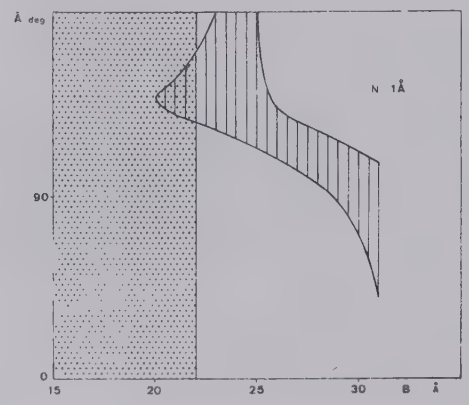


FIG. 6. — *Graphic resolution of the orientation-distance problem.*
Domains are defined in a (A, B) space, for which a good fit is obtained between experimental and simulated values of quenching. The dotted area corresponds to values of parameter B satisfying the condition $0 < B < G\sqrt{2}$ imposed by the presumed closely packed array of cytochrome *c* molecules covering the bilayer. Any couple of values (Â, B) within the hatched area fits the value $\frac{I}{I_0} = 57 \pm 7$ p. cent of experimental maximum quenching produced by cytochrome *c* (see text and fig. 5 for the definition of Â, B, N).

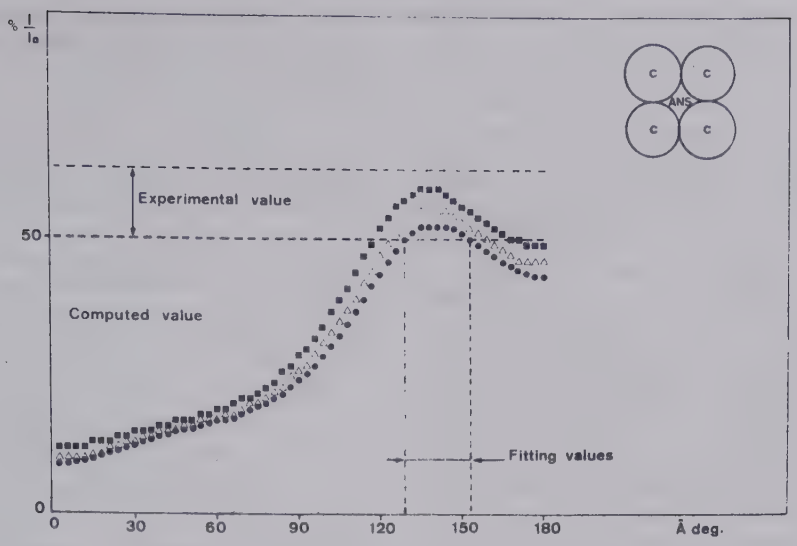


FIG. 7. — *Graphic determination of the orientation parameters of cytochrome c.*

Theoretical simulated values of quenching were plotted for different orientation of the absorption transition moment of the heme and compared with the experimental value. Short range Perrin-Förster energy transfer being efficient for the ANS molecules of the outer leaflet only, the « experimental value » of the quenching efficiency (0.57 ± 0.07) was derived from the observed fluorescence quenching at saturation with cytochrome *c* (extrapolation in the double reciprocal plot cf. fig. 4) by weighing for the distribution of the ANS emittors between the inner and outer leaflets of the vesicles i.e. : $\frac{I_o - I}{I_o} = 0.30. \frac{100}{70}$; hence $\frac{I}{I_o} = 0.57$. B was chosen to be 22 Å and corresponded to the disposition show in the inset (the probe molecule located at the center of a square array of cytochrome *c* molecules). Values of parameters N were : O Å (●) ; 1 Å (△) ; 2.5 Å (■).

resaid restriction ($O < B < G\sqrt{2}$) and fitted the experimentally observed value of quenching efficiency which is $\frac{I}{I_o} = 0.57 \pm 0.07$. As observed from figures 6 and 7, very sharp domains of values for $\hat{A}$ and B were apparent indicating a restricted range of variation of the parameters. Allowed values of B were found to within a few Å (19 to 22 Å) and correspond to a near-maximal distance between the probe and the point of contact of cytochrome *c*. A narrow range of value $\hat{A}$ (142° ± 20°) indicated a clear-cut orientation of the bound protein. On the other hand, parameter N could be varied up to 2.5 Å without modifying this picture noticeably.

DISCUSSION.

Due to its amphiphilic properties, ANS is a good probe which reports on environmental changes occuring at the polar-head-solution interface of organized phospholipids [11]. The orientations of its transition moments are know with precision from investigations on multi-layers [9]. We showed here that the fluorescence properties of ANS bound to microvesicles (quantum yield, λ_{max}) either observed immediately (fast phase) or at the end of the slow phase, are neither dependent on the composition of the vesicles nor affected by changes of the ionic strength of the liquid phase (within the limits of our investigations). These observations indicate that in the phospholipid mixture we investigated very small changes if any, do occur in the environmental properties of the ANS sites. When the kinetics of the process is considered, the observation of a rapid phase is consistent with the existence of a rapid binding of the probe to the outer lipid layer whereas the slow phase is expected to reveal the interaction of ANS with the inner molecular leaflet with a rate being controlled by the slow diffusion of the probe across the bilayer. In the

dilution experiments (prelabelled vesicles added to buffer), dissociation of ANS from the outer leaflet was too fast to be recorded. The identity which we have observed between the early value of the fluorescence signal in these dilution experiments and the total amplitude of the slow phase in the binding experiments (probe free vesicles added to ANS in buffer) is the ground for our interpretation, in agreement with observations reported by other authors. Such a transport of the probe across the bilayer has already been described in the case of microvesicles of pure phospholipids (DPPC, DMPC) provided these systems be in the so-called « fluid state » i.e. above their transition temperature [24, 25]. This condition was fulfilled in our experiments, working at 20°C with natural lecithin mixed with acid phospholipids in a 90:10 ratio. Moreover, biological membranes such as that of mitochondria which we tend to simulate here are heterogeneous and are in fact known to be permeable to ANS [21].

When ANS binding is at equilibrium, the comparison between the fluorescence intensities associated with the rapid and slow phases allows to estimate that respectively 70 per cent and 30 per cent of the probe bind to the outer and inner leaflet in the case of microvesicles of lecithin containing 10 per cent of an ionic species (PA ; PI ; CL). This observation is consistent with the known asymmetry of distribution of phospholipids in microvesicles in which the anionic species are concentrated within the inner leaflet [26]. Increasing the concentration of PA to 14 per cent resulted in a small reduction of the relative amplitude of the slow phase of the fluorescence change due to an even increased repulsion of ANS.

The effect of ionic strength on binding originates in repulsive electrostatic forces between the anionic ANS molecules and the charged phospholipid interface (anionic) which are shielded by increasing the concentration of a neutral salt. The general occurence of such a phenomenon has already been discussed in connection with surface electric potential [11, 27].

The effect of SDS on the fluorescence characteristics of the probe (spectra, life-time) indicated once more that the binding sites are not changed in nature and properties but in affinity. There are two ways by which SDS can lower the apparent affinity of the phospholipid vesicles for ANS. The first is a general charge effect due to the insertion of SDS (anionic) into the phospholipid. The second is a competition between SDS and ANS for the sites with some kind of specificity which can be anticipated from the structural similarities (polar head and hydrophobic part) of the two molecules [28. 29]. Competition for binding between amphiphilic species in not a new concept in the field [30]. However, we did not investigate further the phenomenon and the relative weight of the different contributions cannot be known from present study.

Cytochrome *c* binding to enzymes and membranes was reviewed by Nicholls, a few years ago [31]. Many observations, structural and functional, support the idea that specific and non specific binding of cytochrome *c* does occur in mitochondria or in submitochondrial particles. Electrostatic interactions are generally accepted to have a prominent role in stabilizing the complexes formed either with proteins or with lipids, and distinct patches of positive charges being available on the cytochrome *c* surface at neutral pH [32], binding may be expected to provide a definite orientation of the partners. This orientation problem was investigated in the present work by considering only cytochrome *c* phospholipid interactions in microvesicles where the protein is externally bound.

Confirmatory evidence is presented of a purely electrostatic interaction between ferricytochrome *c* and mixed phospholipid microvesicles of natural lecithin containing an anionic phospholipid species (PA ; PI ; CL) and labelled with the fluorescent probe ANS. Particularly, binding was observed to be completely reversed by adding a moderate concentration of neutral salt (0.1 M NaCl) to vesicles with bound cytochrome *c* preformed at low ionic strength. The absence of penetration of ferricytochrome *c* in the lipid bilayer received recent support from spin label studies [33]. Perrin-Förster fluorescence quenching could be calculated from the apparent effect of cytochrome *c* on the fluorescence emitted by the vesicle bound probe and observed at low ionic strength. The basis for inner filter correction was simply to measure the fluorescence change in control cuvettes all conditions being identical except for ionic strength which was 0.1 M (NaCl). Due to the electrostatic nature of the interaction, the cytochrome *c* molecules were free in the solution at 0.1 M ionic strength. This was evidenced by the following set of observations : (1) a unique fluorescence life-time was present, (2) fluorescence decreased exponentially in accordance with Beer-law when increasing cytochrome *c* concentration (3) for all concentrations of cytochrome *c* used the fluorescence decrease was not dependent on

the composition of the microvesicles, or on the presence of SDS. Simple Beer-law absorption corrections are thus appropriate in the case of microvesicle suspensions which constitute a quasi-isotrope medium in contrast to monolayers or oriented multilayers. Moreover, the absorption spectrum of cytochrome *c* is known to be not changed, or very little, on binding to phospholipid membranes [34, 35]. Perrin-Förster fluorescence quenching could be used to evaluate both the nature and strength of cytochrome *c* binding (experiments with varying concentration of the protein) and the orientation factor of the protein (from maximum fluorescence quenching at saturing concentration of cytochrome *c*).

Our observation with this protein point to the importance of the electric charge density of the lipid surface in being responsible for the more or less pronounced apparent affinity for microvesicles with different compositions. An affinity scale could be established for microvesicles prepared from the following mixtures of natural lecithin and phosphatidylinositol, phosphatidic acid, or cardiolipin :

$$PC \ll PC:PI\ 10:1 < PC:PA\ 10:1 < PC:CL\ 10:1 < PC:PA\ 86:14$$

The role of surface charge density of the lipid phase was further substantiated by showing that a non-lipid species, the surfactant SDS, which is known to be inserted in the bilayer at very low concentration with its charged group at the water interface did facilitate also cytochrome *c* binding.

Experimental evidence support the idea that negatively charged phospholipid surfaces can bind a continuous layer of cytochrome *c* molecules [6, 35]. In our experiments, only the outer surface of the microvesicles was accessible to the protein but not the inner one, so that, as far as Perrin-Förster energy transfer is concerned, quenching of the fluorescence emitted by the probe molecules in the inner leaflet was really negligible due to the thickness of the bilayer ($\simeq$ 60 Å) and the R^{-6} distance law for energy transfer (see Appendix). Consequently, the maximum fluorescence decrease obtained by extrapolating to saturation of the microvesicles with cytochrome *c* and correcting for inner filter effect needs to be compared not to the total unquenched fluorescence but to the contribution of the « external » probe population which is 70 per cent of the total as mentionned earlier. Non specific electrostatic binding of cytochrome *c* with building up of a monolayer of the protein is supported by our observation of linear double reciprocal plots (reciprocal quenching versus reciprocal cytochrome *c* concentration) leading to a unique value of maximum quenching whatever the composition of the microvesicles. The experimental value of Perrin-Förster quenching was found to be $I/I_o = 0.57 \pm 0.7$, a figure much smaller than the value which is anticipated for a purely random binding of the protein (see Appendix). Arguments have been proposed in the litterature which favour non-random binding [34] but orientation parameters have not been worked out so far.

As the orientation of the emission moment of ANS embedded in lipid layers is satisfactorily known [9], a quite simple model could be elaborated which is based on geometric properties of the system and on probe density in the outer leaflet of the vesicles. From this model, theoretical values of Perrin-Förster quenching were computed, the variable parameters being the orientation of the cytochrome *c* molecule and its distance from the fluorescence emitter ANS. On comparing the simulated data with the experimental value of quenching, a very sharp domain of distance-orientation parameters did emerge which corresponds to the heme crevice being largely accessible to the outer solution at the phospholipid interface. Moreover, the experimental quenching value fits the apex region of the simulated unimodal curve, favouring the conclusion of a single solution for the orientation parameters. Despite the non-specific character of the interactions involved in binding cytochrome *c* to anionically charged phospholipid microvesicles a strong selection seems to exist between the different cationic charge patches at the protein surface.

Some evidence was reported previously supporting the idea that the redox state of the heme group of cytochrome *c* may influence the nature of the interaction with phospholipids [36]. This point is of interest but, unfortunately, experimentation with ferrocytochrome *c* was not feasible due to its quite fast reoxidation by dissolved oxygen in our working conditions, especially at low ionic strength. Peroxides generated during sonication [37] or increased autoxidability [35] consecutive to any conformation change in the vesicle bound protein are expected to be responsible for this trouble.

The present work being completed, a short paper by Erecinska, Blasie and Wilson described another approach to the problem of orientation factors of the hemes in functional units of the mitochondria which is based on linear dichroism measurements and EPR spectroscopy using orien-

ted multilayers of membranous cytochrome oxidase with bound cytochrome *c* [38]. Though no clearcut conclusion could be presented by the authors as concerns cytochrome *c*, this work illustrates new trends in the methodological approach of this important problem. Fluorescence measurements on monolayers [39] including light polarization analysis is another new tool which is expected to contribute in the future to a better assignment of these orientation parameters.

APPENDIX.

The model. Cytochrome *c*, a sphere of radius G = 15,5 Å [8], was supposed to be arranged in a continuous monolayer [6, 35], each molecule covering a portion of 750 Å² area at the surface of the microvesicles. A uniform dispersion of both ANS and PA in the PC matrix was assumed, which for the conditions of our experiments (PC:PA 10:1 ; 160 µg/ml in phospholipids ; 20 µM ANS) corresponds on the average to 15 PC and 1,2 PA molecules for every 750Å². ANS being present in a ratio ANS:PC 1:100 (i.e. one ANS molecule for 6 to 7 molecules of cytochrome *c*), the acid phospholipid species (PA) was responsible for the binding of the protein. Thus, the distance B separating an ANS molecule from the point of contact of a cytochrome *c* molecule onto the lipid surface takes value within the limits B = O (cytochrome *c* bound on top of an ANS molecule) and B = G $\sqrt{2}$ (ANS molecule at the center of a square array of cytochrome *c* molecules (fig. 5 and inset of fig. 7). The absorption transition moment of the heme lies within a diametral plane [40], its application point being at a distance of 10.5 Å from the center of the sphere [32]. $\vec{A}$ and $\vec{D}$ are unit vectors defining the orientation of the transition moments of the acceptor (cytochrome *c* heme) and donor (ANS)molecules.

Computer simulation.

Theoretical values of the energy transfer efficiency were computed for the model shown in figure 5 making use of the Perrin-Förster relationship [41].

$$\frac{I}{I_0} = \frac{R^6}{R^6 + R_0^6}$$

where R is the mean distance between the transition moments of the donor and acceptor, and R_0 the critical distance between the donor and the acceptor (ANS and heme of cytochrome *c*) is computed from $R_0 = (J\chi^2 Q_0\, n^{-4})^{1/6} \times 9{,}79\ 10^3$ (Å)

J stands for the spectral overlap integral

$$J = \frac{\int F(\lambda)\ e\ (\lambda)\ \lambda^4\ d\lambda}{\int F\ (\lambda)\ d\lambda}$$

where F (λ) is the fluorescence intensity of the donor and e (λ) the absorption coefficient of the acceptor. J was calculated to be 5,5 10^{-14} cm³ M^{-1} from the experimentally recorded spectra. The refractive index n was chosen to be 1,4 and the quantum yield Q_0 of the unquenched donor was 0.2 as expected from the position of the emission wavelengths [10]. The orientation factor χ is given by $\chi = \vec{D} \cdot \vec{A} - 3\ (\vec{D} \cdot \vec{R})\ (\vec{A} \cdot \vec{R})$ χ^2 and the resulting R_0 values were computed, as were R values, for different $\vec{A}$.

For any possible attachment point of the cytochrome *c* surface, free rotation of the whole molecule was assumed around an axis perpendicular to the interface at that point. This resulted in $\vec{A}$ being distributed on a cone of half angle $\hat{A}$ with the same axis since $\vec{A}$ is in the plane of the heme which is itself contained in a diametral plane of the cytochrome *c* molecule (fig. 5). $\vec{D}$ was taken to be distributed on a cone with an axis perpendicular to the bilayer plane at a distance B from the axis of rotation of cytochrome *c* and with a half angle of 30° which is given by others [9]. Distance B was varied between 0 and 30 Å i.e. within the limits imposed by the density of probe bound to the bilayer. To allow for a possible burying of the probe, parameter N was introduced with definite values ranging from 0 to 2.5 Å. A program was designed to compute I/I_0 ratio from any couple (R, R_0) obtained by varying angle $\hat{A}$ and distance B, for a set of different values of N. Domains of values of these parameters were considered significant which gave agreement with the value of I/I_0 experimentally determined for saturation of the bilayer with cytochrome *c*.

A theoretical value of Perrin-Förster quenching was also computed for a random distribution of the orientation of bound cytochrome *c* molecules ($\chi^2 = \frac{2}{3}$). Any value of the distance B from 0 to G $\sqrt{2}$ being considered equiprobable, the resulting quenching is found to correspond to $I/I_0 < 0.02$. When postulating that all ANS molecules

are located at the center of a square array of cytochrome *c* molecules ($B = G\sqrt{2}$), the figure would be $I/I_o = 0.30$ (*).

Acknowledgments.

The authors wish to thank Pr. L. Monnerie (ESPCI) for use of the fluorescence life-time equipment.

RÉSUMÉ.

L'association du marqueur fluorescent 1,8-anilinonaphtalène sulfonate (ANS) à des microvésicules de lécithine naturelle contenant 10 p. cent d'un phospholipide acide (mélanges 90 : 10) a été étudiée par des expériences cinétiques et d'équilibre. Les mesures cinétiques permettent de distinguer entre fixation rapide sur le feuillet externe et fixation en apparence lente sur le feuillet interne de la bicouche contrôlée par la diffusion transverse du marqueur. La répartition d'équilibre de l'ANS entre les deux feuillets ne dépend pas de la nature du phospholipide acide et les propriétés spectrales de l'ANS lié sont identiques dans tous les cas étudiés. La saturation observée est hyperbolique, ce qui permet de proposer une échelle d'affinité pour l'association de l'ANS à des microvésicules mélanges de lécithine et d'acide phosphatidique, le phosphatidylinositol ou de cardiolipide. Les effets de la force ionique et du dodécylsulfate de sodium (SDS) sur la fixation de l'ANS sont également décrits.

L'association du ferricytochrome *c* du cœur de cheval à des microvésicules marqués par l'ANS a pu être étudiée quantitativement en mettant à profit le phénomène d'extinction de la fluorescence du marqueur par l'hème de la protéine. Des données connues de la littérature qui concernent l'insertion de l'ANS dans les phospholipides et la fixation du cytochrome *c* permettent de proposer un modèle simple qui décrit l'organisation physique du système et sert de base à une analyse du transfert d'énergie de type Perrin-Förster. La comparaison des observations expérimentales avec les prévisions théoriques calculées à partir de ce modèle conduit à proposer une orientation préférentielle de la crevasse de l'hème qui est totalement accessible en direction de l'espace externe à l'interface lipidique.

REFERENCES.

1. Kasai, M., Changeux, J. P. & Monnerie, L. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 420-427.
2. Patrick, J., Valeur, B., Monnerie, L. & Changeux, J. P. (1971) *J. Membr. Biol.*, **5**, 102-119.
3. Andrich, M. P. & Vanderkooi, J. M. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1257-1261.
4. Bashford, C. L., Morgan, C. G. & Radda, G. K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 157-172.
5. Faucon, J. F. & Lussan, C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 459-466.
6. Pohl, W. G. & Teissié, J. (1975) *Z. Naturforschung*, **30 c**, 147-151.
7. Vanderkooi, J., Erecinska, M. & Chance, B. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 531-540.
8. Dickerson, R. E., Kopka, M. L., Borders, C. L., Varnum, J. & Weinzierl, J. E. (1967) *J. Mol. Biol.*, **29**, 77-95.
9. Badley, R. A., Martin, W. G. & Schneider, H. (1973) *Biochemistry*, **12**, 268-275.
10. Stryer, L. (1965) *J. Mol. Biol.*, **13**, 482-495.
11. Haynes, D. H. & Staerk, H. (1974) *J. Memb. Biol.*, **17**, 313-340.
12. Lees, M. B. (1957) *Methods Enzymol.*, **3**, 331-333.
13. Papahadjopoulos, D. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624-638.
14. Baudras, A., Krupa, M. & Labeyrie, F. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **20**, 58-64.
15. Seufert, W. D. (1970) *Biophysik*, **7**, 60-73.
16. Valeur, B. (1975) Thèse de Doctorat, Université de Paris VI.
17. Seliskar, C. J. & Brand, L. (1971) *Science*, **171**, 799-800.
18. Vanderkooi, J. & Mc Laughlin, A. (1976) *in « Biochemical Fluorescence »* (Chen, Edelhoch Ed.), Vol. II, pp. 737-766 ; Dekker.
19. Freedman, R. B. & Radda, G. K. (1969) *F.E.B.S. Letters*, **3**, 150-152.
20. Munn, E. A. (1974) in *The Structure of Mitochondria*, p. 218-232, Academic Press.
21. Gains, N. & Dawson, A. P. (1975) *Biochem. J.*, **148**, 157-160.
22. Layton, D. G., Symmons, P. & Williams, W. P. (1974) *F.E.B.S. Letters*, **41**, 1-7.
23. Nicholls, P. & Malviya, A. N. (1973) *Biochemical Soc. Transactions*, **1**, 372-375.
24. Tsong, T. Y. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5309-5414.
25. Jacobson, K. & Papahadjopoulos, D. (1976) *Biophysical J.*, **16**, 549-560.
26. Berden, J. A., Barker, R. W. & Radda, G. K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 186-208.
27. Gomperts, B., Lantelme, F. & Stock, R. (1970) *J. Memb. Biol.*, **3**, 241-266.
28. George Fortes, P. A. & Hoffman, J. F. (1971) *J. Memb. Biol.*, **5**, 154-168.
29. Hasselbach, W. & Heimberg, K. W. (1970) *J. Memb. Biol.*, **2**, 341-350.
30. Haynes, D. H., *Dechema Monographien « Technische Biochemie »* Tutzing Symposion 1972 der Dechema Band 71 n 1351 1369, 119-133.
31. Nicholls, P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 261-310.
32. Lemberg, R. & Barret, J. (1973) *Cytochromes*, Academic Press.
33. Van S. P. & Griffith, O. H. (1975) *J. Memb. Biol.*, **20**, 155-170.
34. Vanderkooi, J., Erecinska, M. & Chance, B. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 219-229.
35. Steinemann, A. & Läuger, P. (1971) *J. Memb. Biol.*, **4**, 74-86.
36. Letellier, L. & Shechter, E. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **40**, 507-512.
37. Klein, R. A. (1970) *Biochem. Biophys. Acta*, **210**, 486-489.
38. Erecinska, M., Blasie, J. K. & Wilson, D. F. (1977) *F.E.B.S. Letters*, **76**, 235-239.
39. Teissié, J., Tocanne, J. F. & Baudras, A. (1976) *F.E.B.S. Letters*, **70**, 123-126.
40. Eaton, W. A. & Hochstrasser, R. M. (1967) *J. Chem. Phys.*, **46**, 2533-2539.
41. Schiller, P. W. (1976) *in « Biochemical Fluorescence »* (Chen, Edelhoch Ed.) Vol. 1, p. 285-304, Dekker.

(*) The listing of this program (Basic language for Wang 2200 electronic calculator) is available on request from J. Teissié.

CONFIGURATION DU CYTOCHROME c FIXE A DES COUCHES MONOMOLECULAIRES ET A DES MICROVESICULES

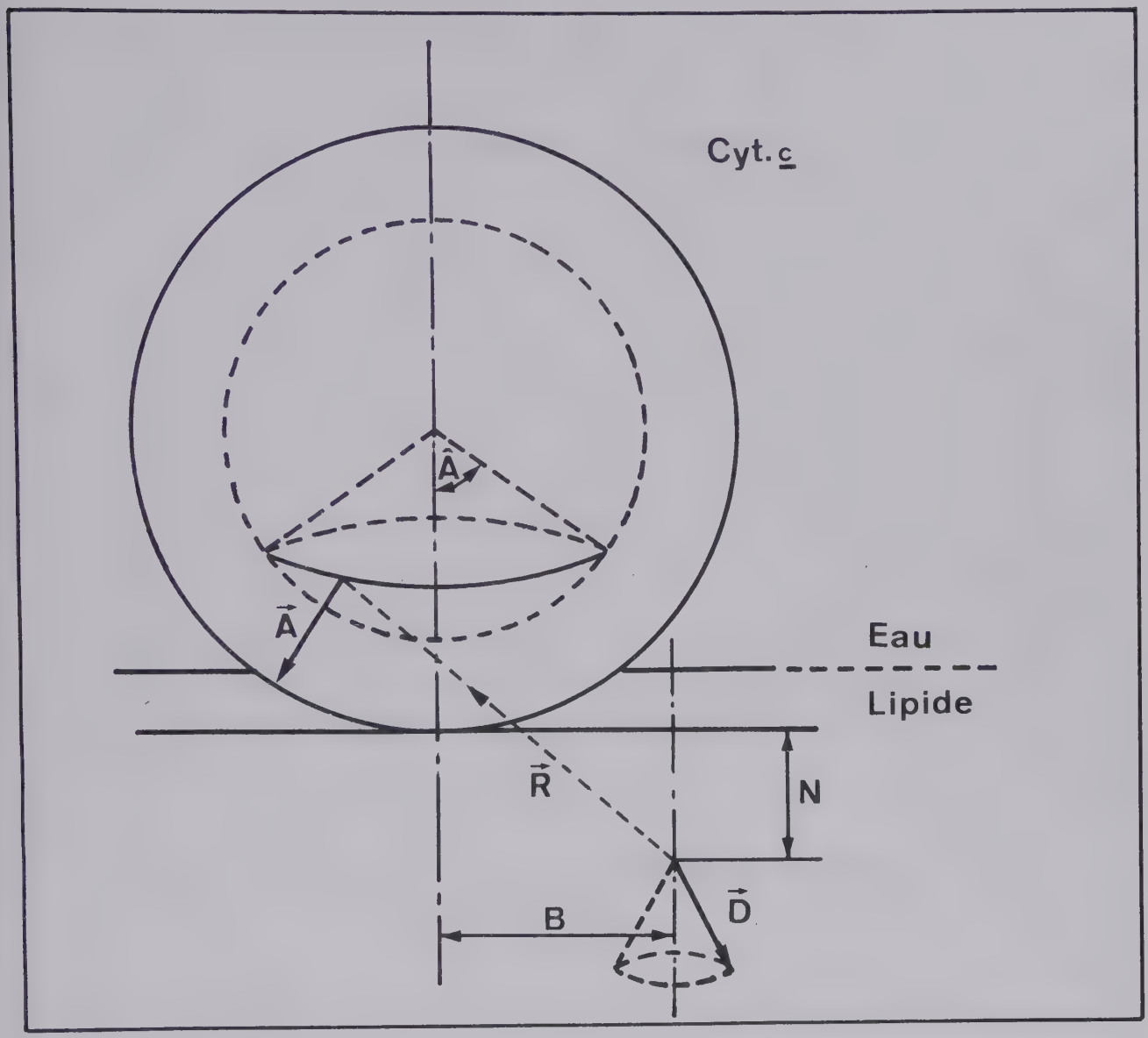


Figure 1

Représentation schématique de la disposition relative du cytochrome c fixé au feuillet lipidique (monocouche ou microvésicule).

L'utilisation de couches monomoléculaires étalées à l'interface air/eau comme modèles de membranes biologiques permet de disposer d'un système où l'aire moléculaire est contrôlée. Ce paramètre est apparu comme critique dans des études antérieures des interactions entre cytochrome c et monocouches de phospholipides (166, 167). L'extension des mesures décrites dans les deux articles qui précèdent à ce type de modèle s'impose pour conclure de manière définitive sur le caractère spécifique de l'orientation de la protéine fixée. Malheureusement, l'extension immédiate des expériences décrites s'avère impossible; nous avons en effet, démontré que la fixation de l'ANS sur les couches monomoléculaires était un phénomène complexe, sensible à la fois à la force ionique de la sous-phase et à l'aire moléculaire du phospholipide hôte. L'utilisation d'un phospholipide portant, lié de façon covalente, un groupe fluorescent, tel le dansylphosphatidyléthanolamine, apparaît donc comme un outil mieux adapté pour ce type d'étude. De plus, le choix d'un nouveau marqueur peut servir de contrôle de la validité de notre méthode dans la définition de l'orientation du cytochrome c lorsqu'il est lié aux microvésicules. Une approche radicalement différente de ce processus peut être envisagée en utilisant une analyse cinétique des phénomènes d'interactions (61, 178). La définition des étapes cinétiques du processus d'ancrage peut permettre d'exclure un mécanisme au hasard, exclusion que contiennent nos conclusions de l'existence d'une orientation privilégiée.

II. INTERACTIONS DU CYTOCHROME c ET DE COUCHES MONOMOLECULAIRES

II.1. Orientation du marqueur

L'utilisation du calcul de simulation décrit exige une définition de l'orientation du moment de transition d'émission du donneur.

Celle-ci peut être déterminée en utilisant la méthodologie décrite dans la première partie. Nous avons donc étendu ces types de mesures à d'autres types de phospholipides : acide phosphatidique, obtenu à partir de lécithine de jaune d'oeuf, mélange de dipalmitoylphosphatidylcholine et d'acide phosphatidique (rapport molaire 10 : 1); ce dernier système simule la composition rencontrée dans les mitochondries.

L'évolution du rapport I(X, YZ) en fonction de l'aire moléculaire est représentée dans la figure 2. Nous constatons que les valeurs obtenues sont les mêmes dans l'état liquide expansé quèl que soit le phospholipide. La décroissance

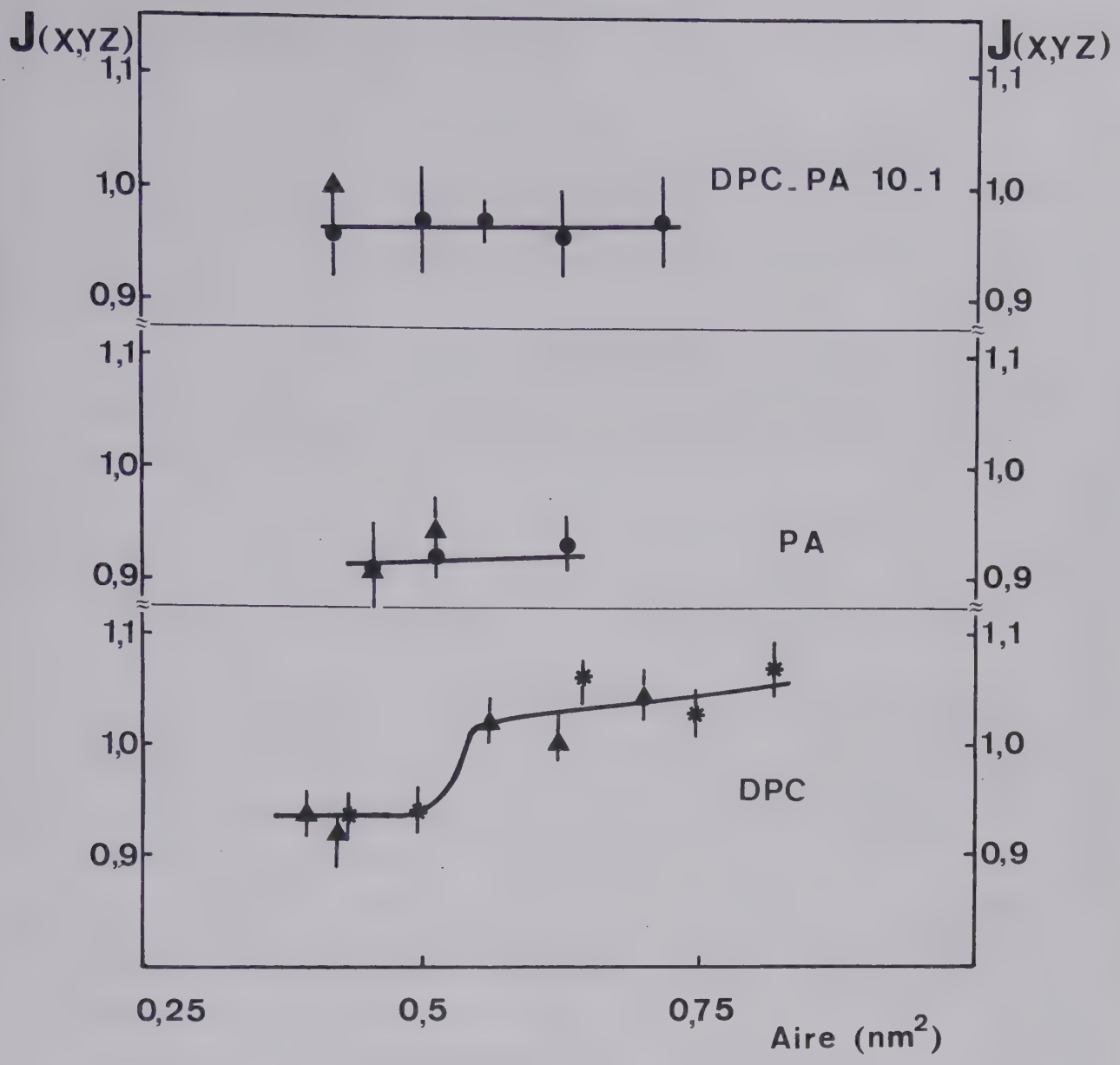


Figure 2 :

Evolution du paramètre d'orientation $\mathcal{J}(X,YZ)$ du DPE en fonction de l'aire moléculaire du phospholipide hôte.

A-DPC sur une sous-phase de 0,1 M NaCl .

B-PA sur une sous-phase 10 mM NaCl (●) et 0,1 M NaCl (▲) .

C-Mélange DPC-PA (10-1) sur une sous-phase 10 mM NaCl (●) et 0,1 M NaCl (▲).

La compression de la monocouche est obtenue par additions successives de lipides.

La fluorescence du DPE (dispersé à 1%) est obtenue en irradiant à la longueur d'onde de 360 nm ($\Delta\lambda$=20 nm) et en observant l'émission à des longueurs d'ondes supérieures à 430 nm.

caractéristique de la transition à l'état gel ne peut être détectée qu'en présence de DPC, seul phospholipide pouvant présenter cet état. Notons qu'elle est abolie dans le mélange. La force ionique de la sous-phase n'affecte pas le rapport I(X, YZ) bien qu'elle soit connue pour moduler l'état d'ionisation des phospholipides acides (179).

Pour la suite du calcul, tenant compte de la mobilité élevée de la sonde telle que nous l'avons décrite dans la première partie, nous utiliserons comme orientation moyenne la valeur de 53°, tant pour le système des monocouches que pour celui des microvésicules.

II.2. Résultats

II.2.1. DPC pur

L'injection dans la sous-phase aqueuse d'une faible quantité de ferricytochrome c induit une diminution progressive du signal de fluorescence émis par le DPE contenu dans la monocouche de DPC (rapport molaire 1 : 100). Le comportement cinétique est représenté par la figure 3, le contenu de la sous-phase étant mélangé pendant toute la durée de l'observation.

La concentration de protéines présentes dans la sous-phase apparaît comme un paramètre critique qui conditionne la cinétique et l'amplitude de ce phénomène. Tous deux croissent lorsque la concentration en ferricytochrome est accrue. Le signal de fluorescence tend vers une valeur limite lorsque cette concentration est progressivement augmentée, comportement typique de l'existence d'une saturation. Comme dans les mesures précédemment décrites, nos mesures de fluorescence constituent donc des indicateurs de la fixation du cytochrome c. Néanmoins, la détermination d'une isotherme de fixation est rendue délicate par l'influence de la concentration de la protéine sur la cinétique de sa fixation. En effet, une telle mesure nécessite l'emploi de quantités de cytochrome c très faibles pour lesquelles l'état d'équilibre n'est atteint que pour des temps supérieurs à 30 minutes; or, l'expérience a révélé que le signal de fluorescence associé aux couches monomoléculaires n'est stable que pour des durées de cet ordre. Dans ces conditions, nous ne pouvons déterminer que la concentration de ferricytochrome c, telle que pour cet état d'équilibre du signal de fluorescence, la moitié de l'inhibition maximum soit observée, $K_{1/2}$. Sauf pour un film à l'état gel étalé sur une solution de 0,1 M NaCl, les valeurs de $K_{1/2}$ ainsi déterminées sont de l'ordre de 0,25 μM, indiquant une affinité élevée.

Figure 3 :

Cinétique d'interaction du cytochrome c et de monocouches de DPC observée par l'inhibition de la fluorescence du DPE inséré dans le film (rapport molaire 1 %).

A-La pression de surface était initialement de 4 $mN.m^{-1}$.

B-La pression de surface était initialement de 30 $mN.m^{-1}$.

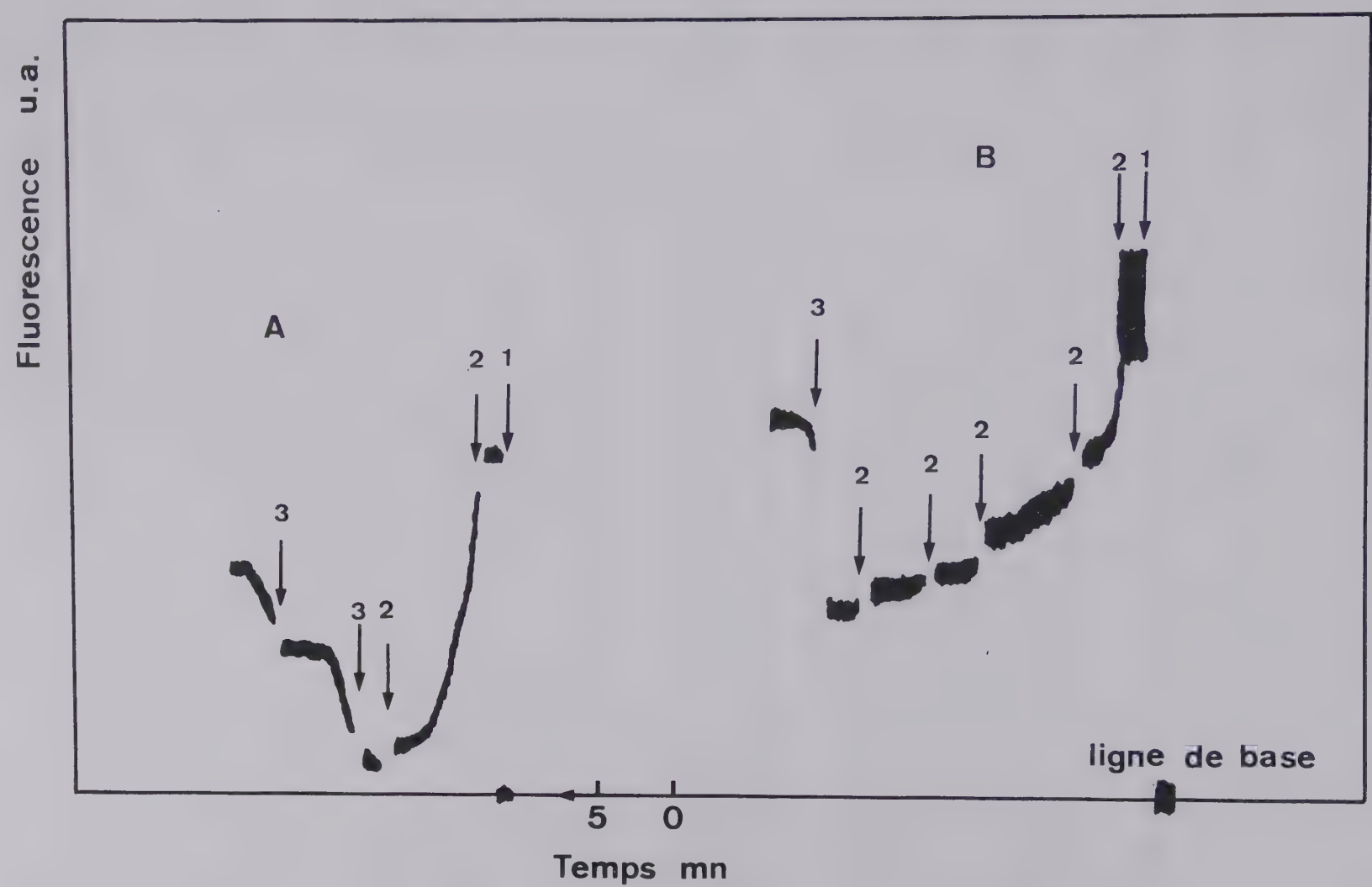
1-Etalement du film .

2-Injection d'une solution de ferricytochrome c dans la sous-phase fournissant un incrément de concentration protéique de 0,25 µM .

3-Injection d'une solution concentrée de NaCl dans la sous-phase fournissant un incrément de concentration saline de 50 mM .

Le film est étalé sur l'eau pure.

Les conditions d'observations sont celles définies pour la figure 2 .


Fluorescence u.a.
A
B
3
3 2
2 1
3
2
2
2
2
2 1
ligne de base
5
0
Temps mn

Dans le cas précis d'un film à l'état gel, étalé sur l'eau pure, l'isotherme de fixation peut être déterminée avec précision. Elle obéit à la loi que fournit un équilibre du type

$$\text{cyt } \underline{c}_{\text{ libre}} + \text{site}_{\text{ libre}} \underset{}{\overset{Kd}{\rightleftharpoons}} \text{cyt } \underline{c}_{\text{ fixé}} \qquad (1)$$

où la notion de sites est relative à un ensemble de molécules de phospholipides où la protéine peut se fixer.

Sur le tableau I, nous avons indiqué les inhibitions observées pour des concentrations saturantes de cytochrome c pour divers états de compression initiale du film et différents contenus en ions de la sous-phase. La fixation du cytochrome c à des couches monomoléculaires (166, 167) entraîne une augmentation de la pression de surface. La pression observée pour des concentrations saturantes de protéines est la même quel que soit l'état de compression initial du film. En conséquence, le paramètre caractéristique de l'entassement moléculaire est celui défini par les conditions initiales.

Cette fixation est réversible comme l'indique la figure 3; une augmentation de la force ionique de la sous-phase sous un film où le cytochrome c est préalablement fixé diminue et finalement, supprime l'inhibition de fluorescence.

En utilisant l'hypothèse qu'une couche monomoléculaire de cytochrome c est formée en contact avec le film lorsque la concentration en protéines croît dans la phase aqueuse et que ce postulat reste valable quelles que soient nos conditions de mesures, la valeur maximale de l'inhibition peut servir d'index de comparaison des divers systèmes. L'amplitude du transfert d'énergie apparaît comme une fonction des deux variables : aire moléculaire de l'hôte, force ionique de la phase aqueuse. Ce transfert est déterminé par la distance et l'orientation relative entre donneur et accepteur.

L'orientation du donneur (DPE) n'apparaît pas affectée par la fixation du cytochrome c comme l'indiquent les déterminations du rapport I (X, YZ) au moins pour des concentrations de protéines correspondant à des inhibitions pour lesquelles ce rapport garde un sens.

Comme dans le cas des microvésicules que nous avons précédemment décrites, B, distance entre les axes perpendiculaires à la membrane et passant respectivement par la protéine et le marqueur, peut varier de 0 à 2,2 nm. La localisation de la sonde au niveau glycérol (110) et la configuration du motif

choline, parallèle au plan de la membrane comme l'indiquent les mesures de RMN et de rayons X (180, 181) conduisent à des valeurs de N (index de pénétration) comprises entre 0 et 0,75 nm.

Le calcul de simulation fournit alors les précisions suivantes. Pour un film initialement à l'état gel ($\Delta\pi$ = 30 mN m^{-1}), l'orientation ($\hat{A}$ égal à 100° ou à 150°) ne semble pas affectée par les variations de la force ionique mais la protéine pénètre d'autant plus dans le film que le contenu en ions de la phase aqueuse est faible. A la limite (0,1 M NaCl) il n'est plus observé de fixation. Pour un film initialement à l'état liquide expansé ($\Delta\pi$= 4 mN m^{-1}), le même comportement est observé, mais, pour une même sous-phase, la protéine est enfouie encore plus profondément dans la membrane. Une exception est le cas de l'eau pure pour lequel l'orientation semble différente ($\hat{A}$ = 80°).

La géométrie du système est indiquée sur les figures 4 A et B. La sonde (DPE) est au centre du réseau des molécules jointives de la monocouche de cytochrome c lié sauf dans de cas de l'exception déjà signalée (film à l'état liquide expansé étalé sur l'eau pure).

Les mesures de retour de fluorescence après photodimérisation de l'acide 12(9-Anthroyl) stéarique ne sont pas modifiées par la présence du cytochrome c dans la sous-phase. Les coefficients de diffusion transverse conservent la valeur déterminée en l'absence de protéine.

II.2.2. Acide phosphatidique

L'injection de cytochrome c sous une monocouche de PA marquée au DPE (rapport molaire 100 : 1) induit une diminution rapide de la fluorescence émise. Même pour les plus faibles concentrations en protéines utilisées (de l'ordre de 10^{-7} M), nous observons une extinction totale de la fluorescence et cela, quelle que soit la sous-phase (Table I).

II.2.3. Mélange DPC-PA (11 %)

La présence de ferricytochrome c sous une monocouche de ce mélange marqué au DPE (rapport molaire 100 : 1) se manifeste par une diminution progressive de la fluorescence émise. Tout comme pour le DPC pur, la vitesse de ce processus dépend de la concentration en protéine. Pour les mêmes concentrations en protéines, elle est intermédiaire entre celles observées dans les deux cas qui précèdent (systèmes purs).

Figure 4

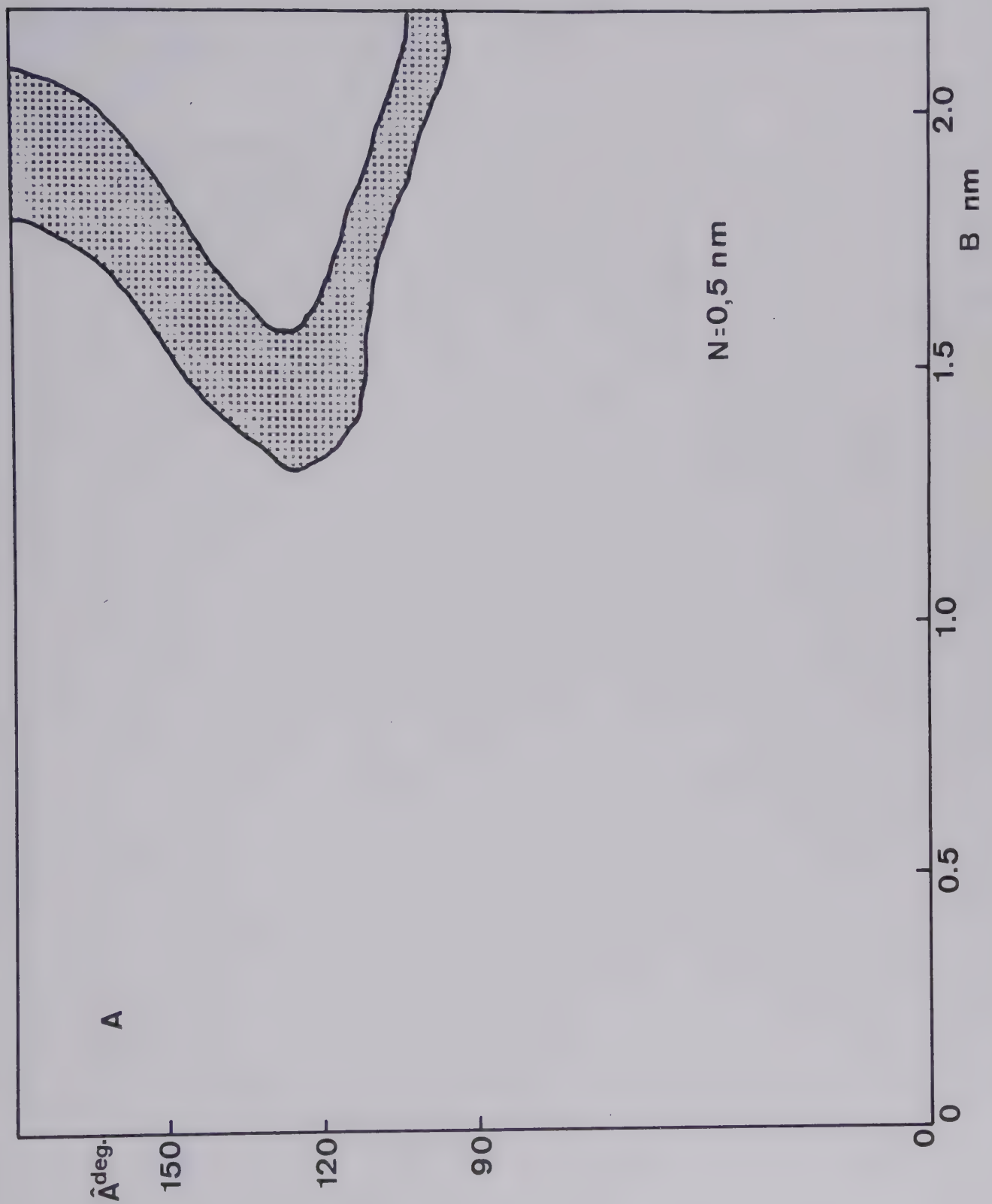
Résolution graphique des paramètres orientation-éloignement ($\hat{A}$,B) du cytochrome c fixé à une monocouche de DPC ,l'inhibition de fluorescence du DPE étant utilisée comme indicateur.

A-Film étalé sur l'eau pure.

B-Film étalé sur 10 mM NaCl.

La pression de surface était 30 $mN.m^{-1}$ avant la fixation du cytochrome.

Les domaines hachurés correspondent aux couples ($\hat{A}$,B) pour lesquels l'inhibition simulée est égale à celle qui est expérimentalement déterminée pour des concentrations saturantes de protéines.


Âdeg.
150
120
90
0
A
N=0,5 nm
0
0.5
1.0
1.5
2.0
B nm

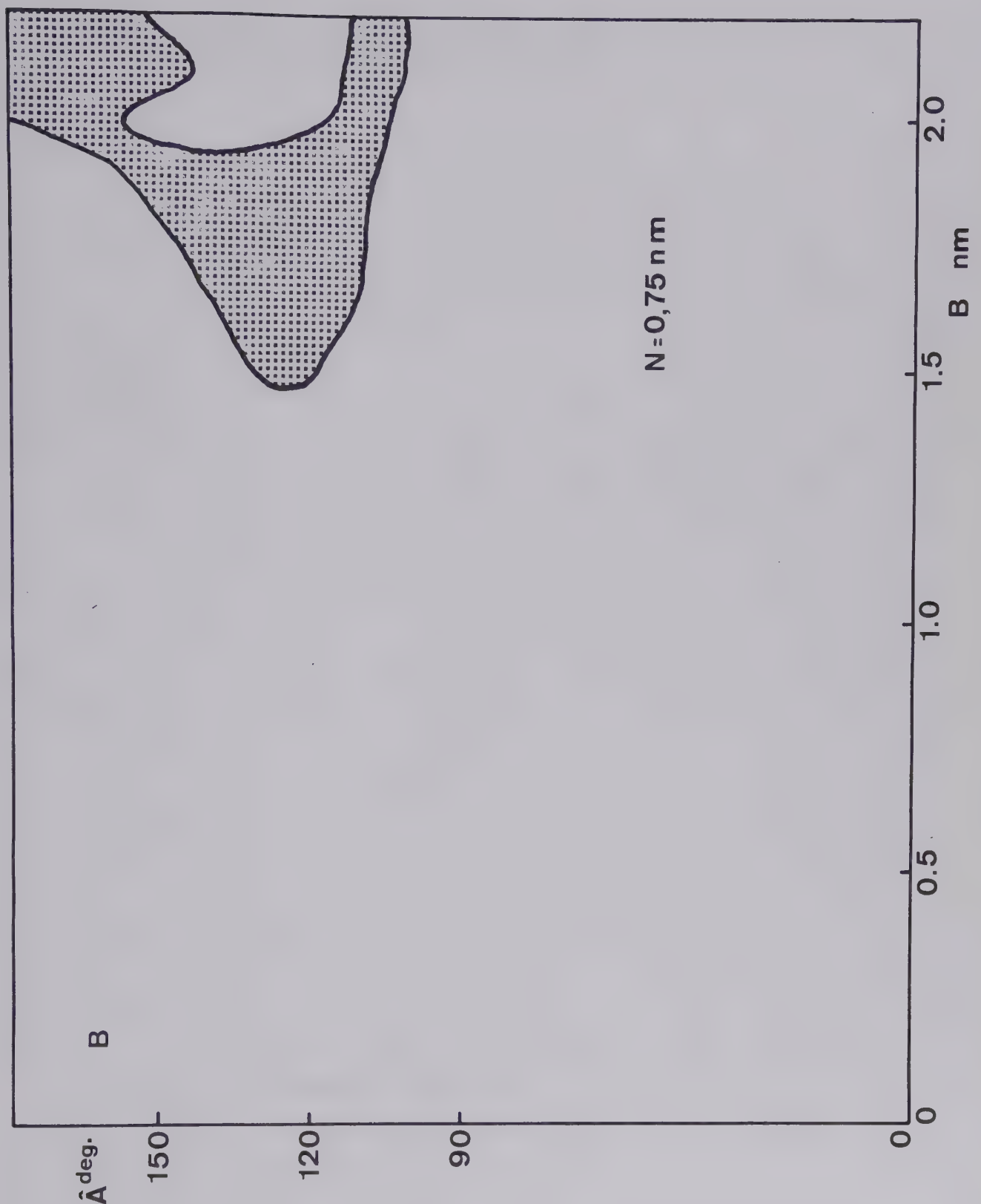

Â deg.
150
120
90
0
B
N=0,75 nm
0
0.5
1.0
1.5
2.0
B nm

TABLE I : Fluorescence observée pour des concentrations saturantes de ferricytochrome c pour diverses monocouches.

A. DPC PURE

sous-phase	eau pure	10 mM NaCl	20 mM NaCl	100 mM NaCl
pression de surface initiale $mN.m^{-1}$				
4	5 ± 5	30 ± 10	65 ± 10	66 ± 10
30	40 ± 10	59 ± 10	84 ± 10	100
B. PA PURE				
aire moléculaire initiale nm^2				
0,46		0		0
C. DPC - PA (11 %)				
0,42		14 ± 3		75 ± 2

Le rapport DPE à phospholipides est égal à 1/100. En l'absence de protéine, la fluorescence est égale à 100.

L'amplitude de cette inhibition présente une valeur limite lorsque la concentration en ferricytochrome c est augmentée. Ce processus est en tout point analogue à celui décrit pour le DPC pur. L'inhibition limite croît lorsque la force ionique de la sous-phase décroît. La concentration fournissant la moitié de l'effet maximum, $K_{1/2}$, est inférieure à $2,5\ 10^{-8}$ M (sous phase 10 mM NaCl).

L'utilisation de notre calcul de simulation permet de déterminer la géométrie du système car l'orientation du donneur n'est pas modifiée par la présence du ferricytochrome c comme l'indique le rapport I(X, YZ).

L'orientation du plan de l'heme est la même que celle déterminée en présence de monocouches de DPC ($\hat{A}$ égal soit à 100°, soit à 150°). La pénétration dans le feuillet lipidique est importante pour une sous-phase constituée d'une solution de 10 mM NaCl (N = 0,25 nm); B étant voisin de 0, le cytochrome c est fixé au voisinage de la sonde. Par contre, sur une solution 100 mM NaCl, aucune pénétration n'est observée (N = 0,75 nm) et la configuration est analogue à celle observée en présence de DPC, la sonde est au centre du réseau des molécules jointives de protéines fixées.

III. INTERACTION DU CYTOCHROME c ET DE MICROVESICULES

III.1. DPC pure

La fluorescence émise par le DPE inséré dans des microvésicules de DPC (rapport molaire 100 : 1) diminue lorsque du cytochrome c est ajouté à la phase aqueuse. La relation liant diminution de fluorescence et concentration en protéine est une exponentielle. Elle ne dépend pas de la force ionique du milieu. Les expériences d'autres auteurs (158) démontrent clairement l'absence de fixation entre microvésicules de lécithine pure et ferricytochrome c. L'effet observé ne peut être associé à un transfert d'énergie; il s'agit simplement d'un effet de filtrage interne du cytochrome c sur la fluorescence du DPE. En tenant compte de l'observation d'autres auteurs (66, 165) selon laquelle le spectre d'absorption du cytochrome c n'est pas modifié par la fixation de la protéine aux membranes phospholipidiques, ces mesures avec des microvésicules de DPC pure permettent un calibrage du filtrage interne dans les expériences qui vont être décrites.

III.2. Mélange DPC-PA (10 : 1)

Une inhibition de la fluorescence du DPE inséré dans des microvésicules de cette composition (rapport molaire de la sonde 1 : 250) apparaît instantanément lorsque du cytochrome c est ajouté à la phase aqueuse. Tenant compte de l'identité des spectres d'émission du DPE lorsqu'il est inséré dans des microvésicules soit de DPC pur, soit du mélange DPC-PA, les mesures décrites au paragraphe III.1. permettent de corriger nos observations de l'effet de filtrage interne. Cette correction effectuée, une inhibition subsiste qui présente un phénomène de saturation pour des concentrations croissantes de protéine. Les diagrammes en double inverse de l'inhibition de fluorescence corrigée du filtrage interne en fonction de la concentration en ferricytochrome c dans la phase aqueuse sont des droites (fig. 5). Ce résultat indique l'existence de l'équilibre

$$\text{cyt c}_{\text{libre}} + \text{site}_{\text{libre}} \underset{}{\overset{Kd}{\rightleftharpoons}} \text{cyt c}_{\text{lié}}$$

Si nous admettons que le processus d'inhibition est dû à un phénomène de transfert d'énergie. Cette hypothèse est corroborée par l'observation suivante : le spectre d'émission du DPE, corrigé de l'effet de filtrage interne, n'est pas déformé par la présence du cytochrome c. Un tel résultat ne serait pas observé si la diminution de fluorescence était la conséquence d'une modification de l'environnement de la sonde (voir Introduction).

Dans une solution 10 mM NaCl, la constante de dissociation est $1,11 \pm 0,07$ µM à 20°C et $1,04 \pm 0,08$ µM à 24°C. Ces valeurs ne dépendent pas de la longueur d'onde d'observation comme il convient de s'y attendre dans un processus de transfert d'énergie (figure 5).

Si nous utilisons une solution de haute force ionique (110 mM NaCl), une inhibition beaucoup plus faible est observée pour laquelle une détermination de la constante de dissociation selon la méthode que nous venons de décrire s'avère impossible, l'effet observé étant trop petit.

La valeur observée de l'inhibition dans des conditions saturantes n'est pas la valeur vraie décrivant le système. En effet, la distribution des phospholipides dans des microvésicules est asymétrique (182) et il convient donc de déterminer la répartition relative du DPE sur les deux faces du feuillet. Pour cela, nous avons utilisé les propriétés d'ionisation de cette sonde dont la forme protonée est non fluorescente (183). La diffusion des protons

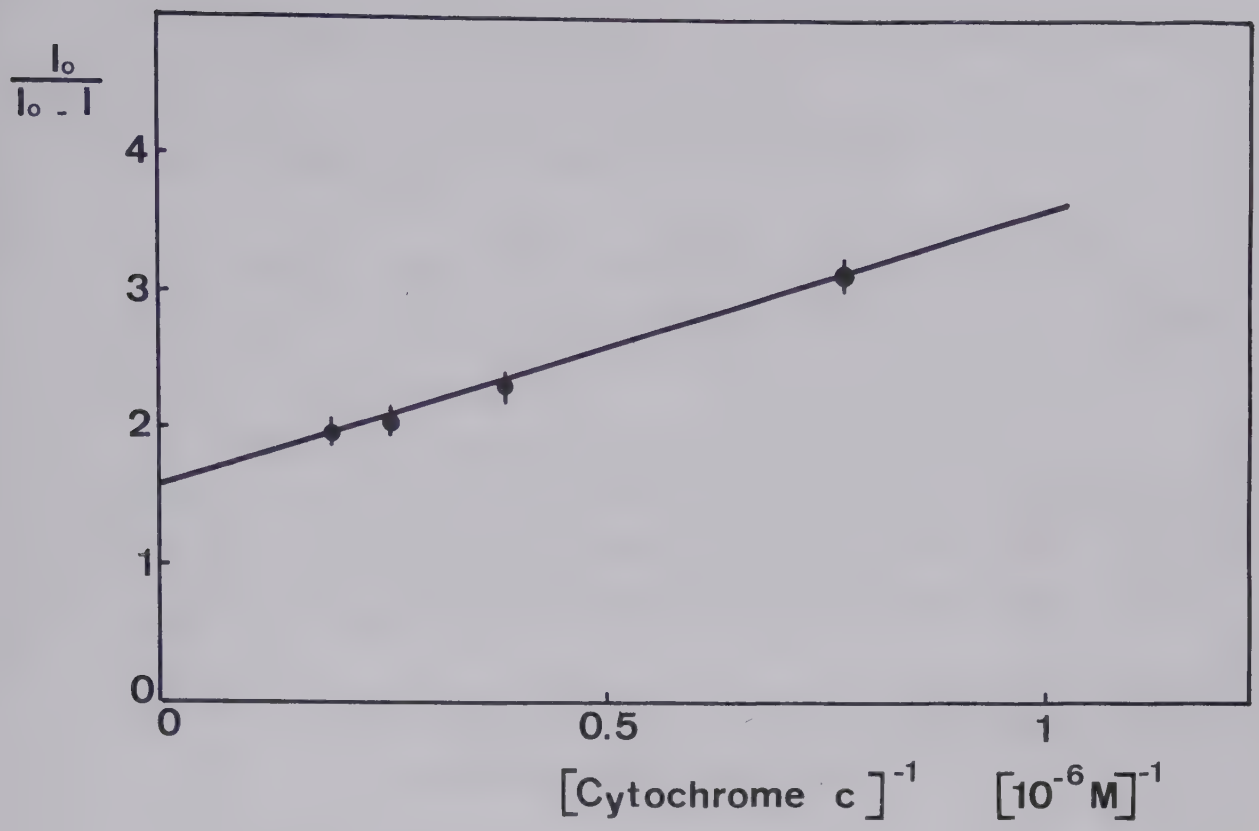


Figure 5

Diagramme en double inverse de l'inhibition de la fluorescence du DPE par transfert d'énergie en fonction de la concentration en ferricytochrome.Le marqueur est inséré dans des microvésicules composées du mélange DPC-PA (10-1) à un rapport molaire 1-250.
La solution est 10 mM NaCl ,la température 20°C .
I_o est la fluorescence en l'absence de protéine et I la fluorescence corrigée de l'effet de filtrage interne.
La longueur d'onde d'excitation de la fluorescence est 340 nm ($\Delta\lambda$= 7,5 nm).La courbe est identique pour une observation de la fluorescence aux longueurs d'onde 490,500,510 et 520 nm ($\Delta\lambda$= 7,5 nm) .

étant limitée par le bifeuillet (184), nous pouvons spécifiquement rendre la face externe non fluorescente par une diminution brutale du pH de la phase aqueuse. Il apparaît ainsi qu'en l'absence de cytochrome c, 78 % de la fluorescence provient de la face externe des microvésicules.

Le processus de transfert d'énergie ne révèle que des effets à courte distance et, comme décrit précédemment pour notre système, seule la face externe est concernée dans le processus d'inhibition. Dans les conditions de saturation, la fluorescence de la face externe n'est que 22 % de celle observée en l'absence de protéine.

Avec l'hypothèse habituelle de constitution d'une monocouche de cytochrome c à la surface du film, notre calcul de simulation indique alors que A vaut soit 100 soit 150°, la pénétration de la protéine dans le bifeuillet est faible (N = 0,5 nm), le point d'ancrage du ferricytochrome c est à proximité de la sonde (B $<$ 1 nm).

III.3. Cinétiques de relaxation thermique du système microvésicules (DPC-PA)-cytochrome c.

Les expériences sur le système des microvésicules composées par un mélange DPC-PA (rapport molaire 10 : 1) indiquent que la fixation du cytochrome c avait une affinité dépendante de la température. La cinétique des évènements liés à la fixation du cytochrome c à ces microvésicules peut être étudiée par des mesures de relaxation thermique. L'observation suit l'évolution de l'inhibition de la fluorescence du DPE inséré dans le bifeuillet (rapport molaire 1 : 250).

L'étude de systèmes de microvésicules en l'absence de cytochrome c dans les milieux 10 mM NaCl et 100 mM NaCl, ou en présence de 1,5 μM ferricytochrome c mais dans le milieu 100 mM NaCl (absence de fixation) montre l'existence de phénomènes rapides. Une augmentation brutale de la fluorescence est détectée qui est suivie d'une chute brutale. Dans le milieu à haute force ionique (100 mM NaCl), ces processus sont plus rapides que la résolution temporelle de notre détection (2 μs) et peuvent être des effets physiques directement associés au profil de décharge. De tels effets ont été décrits pour des microvésicules de DPC (141, 142). Dans le milieu 10 mM NaCl, cette classe de phénomènes apparaît plus lente (τ = 10 μs), mais peut là aussi être associée au profil de décharge si il est tenu compte de la faible resistivité d'une solution aqueuse de basse force ionique. Le temps de décharge des capacités sera donc plus long.

TABLE II : Définition géométrique du complexe phospholipide-cytochrome c lié.

A. MONOCOUCHES DE DPC PUR				
pression de surface initiale mN m^{-1}	4		30	
sous phase	N_{nm}	B_{nm}	N_{nm}	B_{nm}
eau pure	0,25		0,5	> 1,4
10 mM NaCl	0,5	> 1,4	0,75	> 1,4
100 mM NaCl	0,5	> 1,4		
B. MONOCOUCHES DU MELANGE DPC-PA (10-1)				
pression de surface initiale mN m^{-1}	25			
10 mM NaCl	0,25	< 0,7		
C. MICROVESICULES COMPOSES DU MELANGE DPC-PA (10-1) (θ = 20°)				
10 mM NaCl	0,5	< 0,7		

Les paramètres N et B sont définis dans la figure 1.

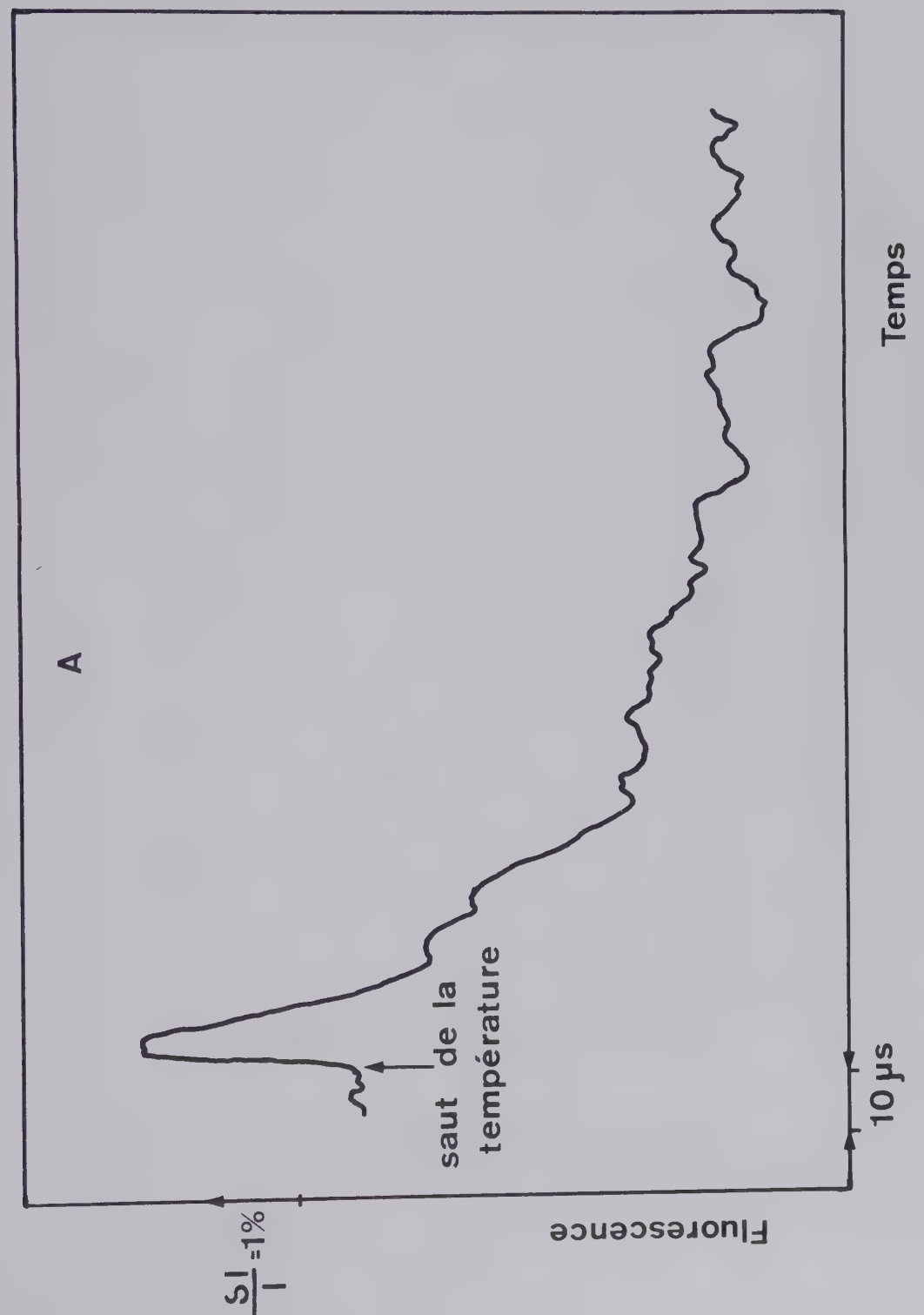
Figure 6

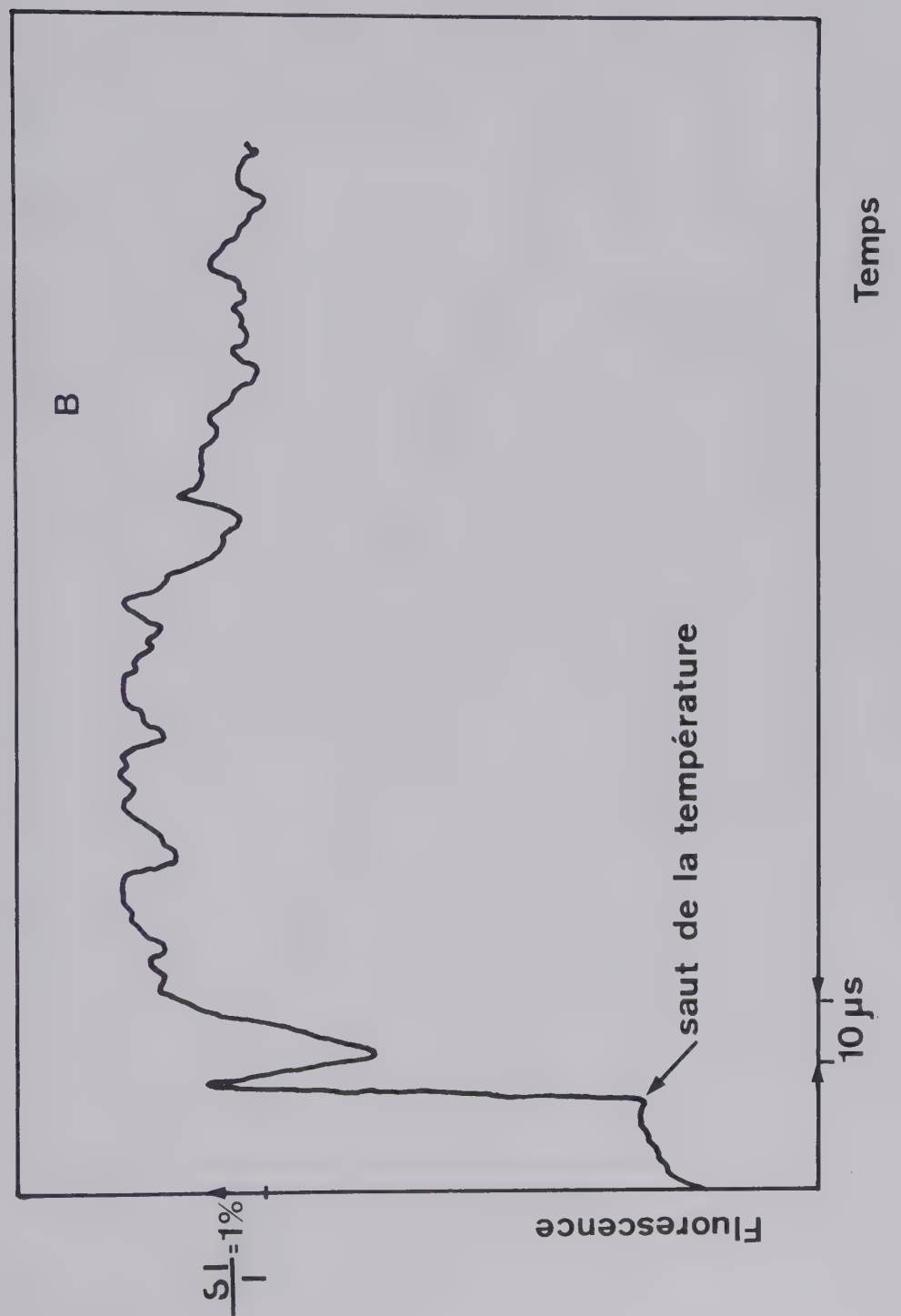
Cinétique d'interaction du ferricytochrome c et de microvésicules composés du mélange DPC-PA (10-1).

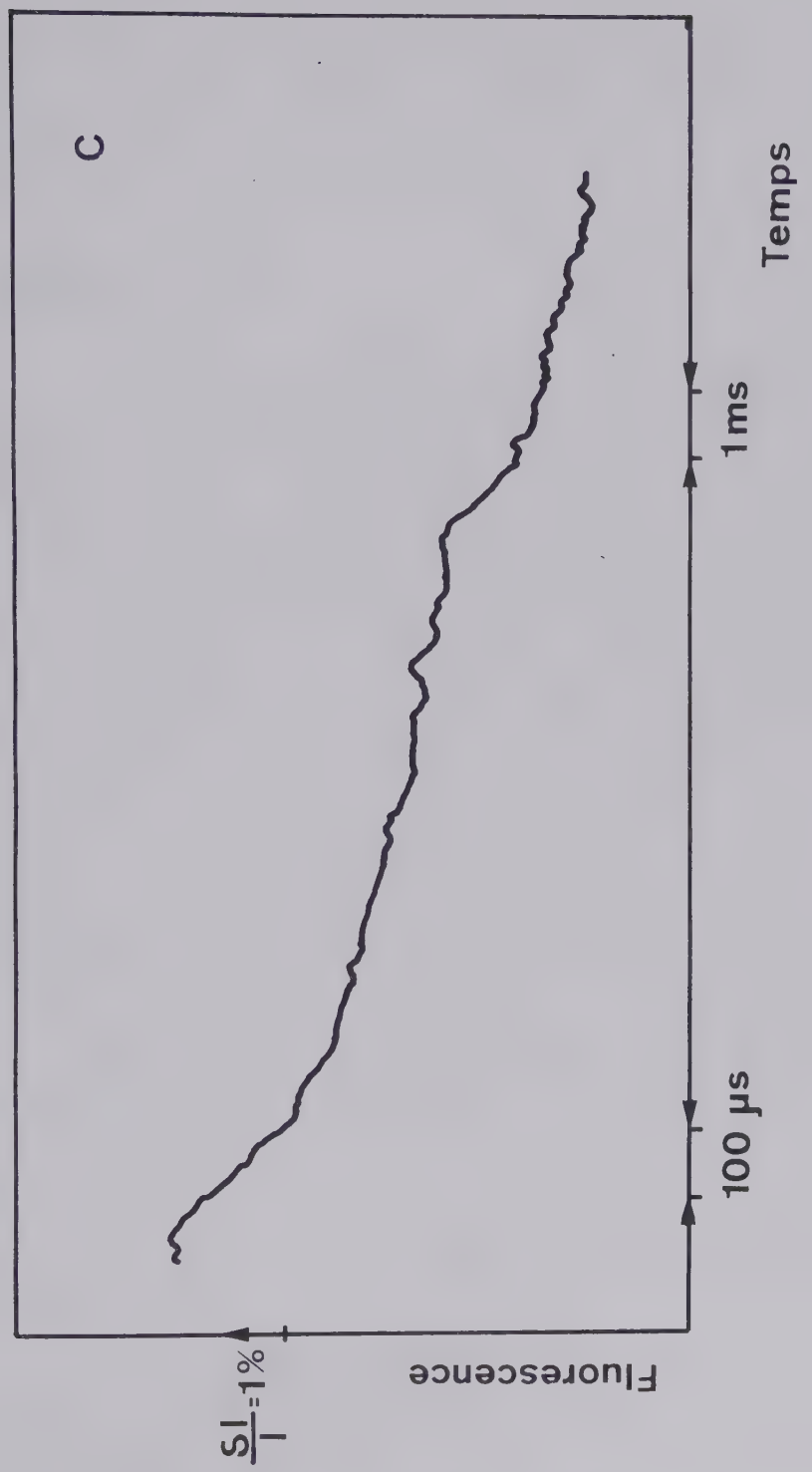
Le signal est l'évolution de la fluorescence du DPE inséré dans les microvésicules (rapport molaire 1-250) suite à un saut de température de 1°C (valeur calculée) .La température initiale était 20°C..La concentration en phospholipides est 0,4 $mg.mL^{-1}$ dans un milieu 10 mM NaCl .

A- Pas de cytochrome présent.
B,C- Après addition de 1,5 µM de protéine.

En A et B,la constante de temps est 2 µS,en C,50 uS.
La longueur d'onde d'excitation est 340 nm ($\Delta\lambda$=6,6 nm),les longueurs d'onde d'émission sont sélectionnées par un filtre Kodak Wratten 4 .


A
saut de la température
Fluorescence
Temps
10 µs
ΔI/I =1%


B
saut de la température
10 µs
Temps
Fluorescence
ΔI/I=1%


C
Fluorescence
ΔI/I=1%
100 µs
1 ms
Temps

Pour un système réalisé dans des conditions où les mesures statiques montrent une association cytochrome c - microvésicules (1,5 µM ferricytochrome c, solution 10 mM NaCl), les évènements cinétiques sont beaucoup plus complexes (figure 6). Dans la gamme des 100 µs, plusieurs processus non résolus dans le temps apparaissent. Des temps de relaxation supérieurs à 500 µs, sont également détectés, caractéristiques de ce système. Tous sont associés à une inhibition accrue de la fluorescence.

IV. DISCUSSION

L'analyse de l'orientation du groupement dansyl du DPE pour les divers systèmes en couches monomoléculaires étudiées (DPC, PA, DPC-PA) montre que ce paramètre est pratiquement insensible à la nature de la tête polaire et que, de plus, il n'évolue que peu avec l'aire moléculaire du phospholipide. Une telle observation est en accord avec la localisation postulée pour le groupe chromophore (110). Celui-ci sonde la partie glycérol, région dont la configuration n'est que peu affectée par la nature de la tête polaire. Nous pouvons de plus affirmer que dans le cas du phospholipide acide, le contenu en ions de la phase aqueuse ne modifie pas la configuration du DPE contrairement à ce qui a été proposé par ailleurs (183).

L'insensibilité de ce marqueur, sur le plan orientation, aux paramètres aire moléculaire et état de la tête polaire en fait un indicateur de choix pour notre analyse. En effet, notre calcul de simulation exige que l'orientation du donneur soit connue et qu'elle ne soit pas affectée par la fixation du ferricytochrome c, ce qui est le cas avec ce système.

Les expériences que nous avons décrites sur les systèmes des films noirs et des microvésicules ont confirmé le caractère essentiellement électrostatique des interactions entre le ferricytochrome c et les bifeuillets lipidiques. Une telle conclusion est également valable dans le cas des monocouches. La modification de la force ionique de la phase aqueuse modifie le processus de fixation , tant en terme d'affinité que sur celui de la structure du complexe formé.

L'aspect cinétique de cette réaction d'interaction met en évidence le rôle critique joué par la concentration de la protéine et par la présence de charges négatives à l'interface lipidique dans le cas de couches monomoléculaires. Cette observation est une confirmation de l'hypothèse selon laquelle

le mécanisme de fixation est limité par la diffusion de la protéine et facilité par les interactions électrostatiques protéine-lipide (167). La probabilité de chocs étant beaucoup plus grande dans le cas de microvésicules, l'état d'équilibre est atteint immédiatement, il n'existe pas de cinétique d'interactions.

Notre calcul de simulation met en évidence l'existence d'un terme de pénétration de la protéine dans le feuillet lipidique. Ce point a fait l'objet d'un débat à la suite d'expériences contradictoires en RPE (162, 163, 169). Dans le cas du DPC pur, le terme de pénétration apparaît modulé par l'aire moléculaire du phospholipide hôte et par le contenu en ions de la phase aqueuse. Si le film est peu compact (état liquide expansé) et/ou si le contenu en NaCl de la sous-phase est faible, la pénétration est importante. La première observation se comprend aisément, la seconde met l'accent sur l'importance des forces électrostatiques dans ce phénomène d'interactions. Cette dernière conclusion est renforcée par l'observation d'une pénétration très importante lorsque des phospholipides acides sont présents, donc lorsque les forces électrostatiques sont plus intenses. Notons que néanmoins, dans le cas du PA, la faible taille du motif de la tête polaire peut expliquer une pénétration plus importante.

La disposition relative de la sonde et de la protéine fixée telle qu'elle est indiquée par le paramètre B apparaît comme très sensible à la nature du film. Pour du DPC pur, B est proche de sa valeur maximum, au contraire,en présence d'espèces chargées (DPC : PA, 10 : 1), B est voisin de 0. L'affinité élevée du ferricytochrome c pour les espèces chargées a conduit à postuler l'existence d'une séparation de phase dans le cas du mélange DPC : PA (163). Les espèces chargées s'associent au voisinage de la sonde qui se trouve ainsi très proche de la protéine fixée. Cette séparation de phase pourrait être induite soit par la fixation de la protéine, soit par la différence du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras. En effet, le DPC possède des chaînes totalement saturées alors que le DPE et le PA utilisés sont des dérivés de lécithines de jaune d'oeuf dont les chaînes d'acides gras possèdent des degrés d'insaturation variables. Pour les faibles aires moléculaires, le DPC va se trouver à l'état gel alors que le PA et le DPE vont rester à l'état liquide expansé. Une telle situation peut donc provoquer une séparation de phases (142).

Dans le cas de l'utilisation du DPE comme sonde, le calcul de simulation conduit à une ambiguité dans la définition de l'orientation de l'hème du cytochrome c fixé : $\hat{A}$ pourrait prendre les valeurs 100° ou 150°.

Les résultats précédemment décrits dans l'étude utilisant l'ANS comme

indicateur permettent d'éclairer ce point. Pour des systèmes de microvésicules composés d'un mélange de phospholipides (lécithine de jaune d'oeuf, phospholipide acide), une seule orientation ($\hat{A} = 140° \pm 20°$) a été déterminée. La comparaison des résultats obtenus en présence de microvésicules, en utilisant comme indicateur soit l'ANS, soit le DPE montre que seule, la solution $\hat{A} = 150°$ est à retenir pour le second cas. De plus, les résultats qui viennent d'être décrits montrent que la configuration du cytochrome c lié est la même pour le système des monocouches et pour celui des microvésicules. En conclusion, l'orientation la plus probable du plan de l'hème de la protéine fixée est celle qui correspond à $\hat{A} = 150°$.

Le comportement des couches monomoléculaires et des microvésicules est analogue en ce qui concerne les termes d'orientation, la nature des forces d'interactions et l'existence d'un terme de pénétration. Les deux modèles se comportent donc comme des cibles équivalentes pour la fixation du cytochrome c et il est donc possible de choisir l'un ou l'autre en fonction de l'objectif recherché. Les microvésicules constituent donc l'instrument de choix pour les mesures de relaxation thermique. L'objectif recherché était l'obtention d'arguments confirmatoires de l'existence d'une orientation privilégiée mais en aucune manière la démonstration de cette propriété et sa définition, ainsi que celle des termes de pénétration.

Les expériences décrites fournissent quelques indications mais leur analyse s'avère délicate. La technique de relaxation thermique implique, outre l'élévation de la température dans la solution, la création brutale d'un champ électrique intense. L'étude des phénomènes créés par cette perturbation dans le cas de globules rouges (193, 194) montre que le passage du courant induit un potentiel transmembranaire. En effet, dans le cas d'une sphère creuse de rayon interne Ri et de rayon externe Re placée dans un champ électrique E_0, le potentiel transmembranaire induit $\Delta\phi$ est égal à :

$$\Delta\phi = 1{,}5 \left(1 - \frac{3\mu (R_e^2/R_i^2)}{(R_e^3/R_i^3) - 1} \right) R_e E_0 \cos\theta$$

où μ désigne le rapport des conductivités de la phase transmembranaire et de la phase aqueuse

θ l'angle entre le vecteur courant et le vecteur radial passant par le point étudié

Dans le cas d'un microvésicule, le potentiel voit son expression se simplifier à

$$\Delta\phi = 1{,}5\ R_e\ E_0 \cos\theta$$

et pourra atteindre des valeurs de l'ordre de 30 mV dans nos conditions de mesure (30 kV de charge). Ce potentiel est trop faible pour induire la rupture du microvésicule, la tension de claquage étant estimée à 200 mV (194) mais peut modifier le rendement quantique de la sonde, l'état d'ionisation des phospholipides acides et l'affinité du cytochrome c pour son site récepteur. Aucun effet de dichroïsme électrique n'avait été détecté lors de l'étude faite par TSONG sur des systèmes lipidiques purs (mesure par turbidité) (141). En conséquence, lors du temps de chauffe mais aussi temps de passage du courant, les microvésicules sont soumis à des perturbations multiples. Cela se traduit sur la plan des enregistrements par des transitoires complexes. Lorsque la fixation n'intervient pas, seuls sont présents les processus associés à la décharge tels que nous venons de les énoncer. Dans des conditions où la fixation peut être démontrée par des mesures statiques, le processus est compliqué par les termes d'interaction avec la protéine. Aux temps courts (inférieurs à 50 μs, fig. 6 B), plusieurs phénomènes antagonistes sont observés. Mais l'évènement intéressant dans le but recherché est l'existence de cinétiques lentes ($\tau > 500\ \mu s$) (fig. 6 C). Un mécanisme d'adsorption au hasard du cytochrome c qui présente des groupes chargés exposés à sa surface n'est pas compatible avec cette observation car il correspond à des interactions ion-ion connues pour être rapides (61, 195). Par contre, son analyse selon le schéma proposé pour la fixation d'un amphiphile à des dispersions lipidiques (61, 178) est possible. Selon cette hypothèse, l'étape d'ancrage (rapide) est suivie de la phase de réorientation (lente). Ceci ne constitue qu'une possibilité d'interprétation de nos résultats, la conclusion essentielle est de confirmer l'impossibilité d'un ancrage au hasard en utilisant une méthodologie différente de celle de notre calcul de simulation.

CONCLUSION

Comme nous pouvions nous y attendre d'après les observations déjà publiées, l'interaction du cytochrome c avec les structures lipidiques organisées est dominée par des termes électrostatiques. Ceci est vrai pour les trois types de membranes modèles étudiés. Par contre, il convient de noter l'affinité particulièrement élevée observée lors des expériences avec les couches monomoléculaires. Les constantes de demi-effet, $K_{1/2}$, sont en effet de l'ordre de quelques fractions de μM, soit au moins 10 fois plus faibles que pour les microvésicules, les déterminations avec les films noirs restant trop imprécises mais dans ces ordres de grandeur. Si, comme le suggèrent nos observations, la fixation du cytochrome c correspond à une fixation sur site, alors $K_{1/2}$ serait la constante de dissociation de l'équilibre pour tous les systèmes étudiés. De plus, pour les couches monomoléculaires, les fixations sont observées même avec des lécithines pures à l'état gel. Cette observation avait été rapportée pour des systèmes à l'état liquide expansé (166, 165) mais aucune fixation n'a jamais été démontrée dans le cas des suspensions de microvésicules. Une des interprétations les plus simples de cette différence de comportement fait intervenir des facteurs géométriques. Par leur rayon de courbure élevé, les microvésicules ne constituent pas des cibles privilégiées pour les molécules de cytochrome c sauf lorsque des groupes fortement chargés négativement sont présents comme par exemple dans les assemblées mixtes lécithine-acide phosphatidique. Au contraire, par leur structure plane, les couches monomoléculaires tout comme les films noirs peuvent présenter des interactions plus favorables et efficaces entre les protéines et les dipoles phosphate-choline. Ces derniers sont disposés en un réseau régulier rendant plus probable la formation d'un complexe stable. Une autre explication est purement électrostatique : les lignes de champ électrique associé ne sont pas les mêmes dans le cas d'une sphère (microvésicule) que pour un plan (monocouche). Toutefois, nous avons conscience du caractère approximatif de cette analyse compte tenu de la complexité que représente une interface phospholipide-solution aqueuse sur le plan électrostatique (34). Un autre paramètre intervient lorsque la fixation comporte un terme de pénétration. Dans ce cas, il est concevable qu'un microvésicule se prête plus difficilement à la déformation nécessairement liée à cette pénétration. Il faudra donc des interactions à haute énergie pour permettre la fixation, telles celles qui existeront si des phospholipides acides sont présents dans l'assemblage lipidique. Une telle déformation est plus aisément concevable dans le cas de couches mono-

moléculaires. La fixation pourrait intervenir même par de simples interactions d'origine dipolaire.

Notons que ce terme de pénétration est modulé par les paramètres, force ionique de la sous-phase et aire moléculaire des phospholipides. Le premier indique le caractère électrostatique des termes d'interactions. En aucune façon, nos observations ne permettent de révéler ou de réfuter l'existence d'une autre contribution. Par contre, si cette dernière existe, elle ne présente qu'un caractère secondaire et n'est pas le facteur décisif dans cette interaction.

L'observation la plus originale qui émerge de nos expériences est la mise en évidence d'une orientation privilégiée du cytochrome c lorsqu'il est fixé à un assemblage phospholipidique. De plus, cette orientation est la même quel que soit le modèle de membrane que nous avons utilisé (microvésicules, monocouches). Pour les films noirs, la détermination de ce paramètre est beaucoup moins précise, mais elle n'est pas en contradiction flagrante avec les résultats obtenus avec les autres membranes modèles.

Nous proposons donc une configuration de l'ensemble cytochrome c - phospholipides où la protéine serait liée en présentant la crevasse de l'heme tournée vers la phase aqueuse. Ce modèle d'organisation laisse ouverte la possibilité d'interactions entre le cytochrome c fixé et d'autres protéines avec lesquelles un transfert d'électrons interviendrait, impliquant un cheminement le long de la crevasse de l'heme (157)

Le caractère privilégié de cette orientation est également apparent par le fait de son insensibilité aux variations des facteurs suivants : entassement moléculaire des phospholipides et force ionique de la phase aqueuse. Par contre, ces deux facteurs modulent le terme de pénétration de la protéine dans l'édifice lipidique. Plus l'aire moléculaire est grande, plus la pénétration est importante. Plus la force ionique est faible, donc plus les termes électrostatiques seront importants, plus la pénétration sera importante.

L'orientation que nous proposons n'est pas en contradiction avec celle indiquée par les mesures de RPE de réinsertion de cytochrome c modifié dans des membranes modèles (162, 158).

L'implication de cette conclusion sur l'organisation de l'édifice mitochondrial doit tenir compte de la complexité de ce dernier. Dans un article de revue, NICHOLLS (157) avait souligné les problèmes soulevés par les interactions que subit le cytochrome c in vivo. Les données tant structurales que

cinétiques montrent que cette protéine peut former des complexes avec divers constituants de la chaîne mitochondriale, tant protéiques ou lipoprotéiques que lipidiques. Les études du système cytochrome oxydase-cytochrome c (185) et de l'association cytochrome c réductase-cytochrome c (186) montrent que l'orientation que nous avons déterminée n'est pas compatible avec ces observations. Cette apparente contradiction pourrait être expliquée par l'existence d'une autre configuration du cytochrome c par rapport au feuillet lipidique lorsqu'il se trouve en interaction avec ces types de protéines, protéines intrinsèques membranaires. L'existence de "sites secondaires" avait été postulée par NICHOLLS dans l'article cité ci-dessus.

Si nous limitons notre étude aux classes de sites pour lesquelles les lipides sont impliqués, nous pouvons décrire trois systèmes :

1) Dans la mitochondrie, le complexe lipide-cytochrome c n'existe pas, seuls existent les systèmes multiprotéiques. Sous cette condition, notre étude ainsi que toutes celles opérées à l'aide de systèmes modèles n'aboutissent qu'à des conclusions fausses liées au caractère artificiel du support membranaire choisi

2) La cytochrome-oxydase est connue pour posséder un "anneau" de lipides structurés (29) l'isolant du reste du feuillet. Cette gaine possède des propriétés physico-chimiques la distinguant de l'ensemble. Il est alors imaginable que le cytochrome c fixé au voisinage intime de la cytochrome oxydase soit ancré par ces phospholipides d'un genre particulier. Dans ces conditions, son support n'est plus identique à celui qui existe dans les modèles. Il est possible d'envisager une réorientation des têtes polaires, une modification des lignes de champ électrique etc... Tous ces paramètres peuvent amener une nouvelle orientation du cytochrome c plus en accord avec la réalisation du complexe protéine-protéine.

3) La dernière hypothèse réside dans la possibilité de la coexistence des deux types (au moins) d'ancrage. Le cytochrome c peut se fixer directement sur son site d'origine protéique ou se lier aux phospholipides de la matrice membranaire. Cette deuxième classe de sites jouerait alors un rôle de réserve.

En conclusion, bien que notre configuration laisse disponibles les résidus (Lys, 72, 73) impliqués dans le complexe cytochrome oxydase-cytochrome c (187, 188), seule notre hypothèse 2 rendrait possible l'existence d'une

double liaison du cytochrome c à la fois à l'autre protéine et à l'assemblage lipidique.

L'autre conclusion à laquelle nous conduisent nos expériences est celle d'une apparente absence de perturbations du feuillet lipidique. Deux termes ont été étudiés :

- l'orientation de la dansylphosphatidyléthanolamine, marqueur du groupe glycérol n'est pas perturbée par la fixation du cytochrome c
- la mobilité transverse du lipide fluorescent, l'acide 12-(9-Anthroyl) stearique que nous avons mesurée par méthode de retour de fluorescence après photoaveuglement, n'est pas affectée par la présence du cytochrome c lié.

Néanmoins, ces conclusions doivent tenir compte des limitations suivantes. Pour le terme d'orientations, il apparaît de façon systématique dans le calcul de simulation que le marqueur est situé dans la région la plus éloignée du point d'ancrage du cytochrome c. Ce qui se passe réellement dans le voisinage intime de la protéine liée n'a pas été étudié par notre méthode. De même, les termes de diffusion constituent une mesure globale et ne peuvent distinguer l'existence éventuelle de phospholipides immobilisés en conséquence de leur liaison avec le cytochrome c.

Malgré ces deux limites, nos observations démontrent aussi bien sur le plan structural que sur le plan dynamique qu'une large fraction du feuillet lipidique n'est pas affectée par la fixation du cytochrome c. En d'autres termes, si l'interaction du cytochrome c avec les lipides induit une perturbation de la matrice lipidique, celle-ci reste localisée. Cette conclusion, si nous adoptons les modèles de membranes biologiques récents (26, 27, 28),permet d'affirmer qu'in vivo, la fixation du cytochrome c au sein de la mitochondrie, que ce soit sur les sites de nature protéique ou sur ceux d'origine phospholipidique, n'affecte de manière directe ni la structure ni la dynamique du feuillet lipidique.

ANNEXES

ANNEXE 1

REALISATION DES COUCHES MONOMOLECULAIRES

L'un des critères essentiels pour la bonne marche de ces expériences est celui de la pureté du produit et de la propreté des systèmes utilisés. Le non respect de ces exigences conduit à une impossibilité de reproduire les expériences.

Les cuves utilisées ont été réalisées dans du polyméthacrylate, matériau transparent. Le haut de la cuve pouvait éventuellement être recouvert de polytétrafluoroéthylène dispersé à partir d'une bombe aérosol (Kontaflon 85, Kontakt Chemie, Allemagne).Ce dernier traitement augmente le caractère hydrophobe du matériau. Avant usage, la cuve est nettoyée à l'eau additionnée de Teepol, rincée abondamment à l'eau ordinaire puis à l'eau ultra-pure (origine Motorola, France). Un nettoyage à l'éthanol sera effectué en fin d'expérience pour éliminer des traces éventuelles de phospholipides.

Les solutions aqueuses sont préparées dans de l'eau ultra-pure (origine Motorola, France) à l'aide de sels de qualité pour analyse (Normapur, Prolabo, France) (pro analysi, Merck, Allemagne). Une filtration à travers des filtres Millipore GSTF 04 700 (Millipore, France) permet l'élimination des poussières restantes. L'aire par molécule est modifiée soit par addition successive de phospholipides avec des cuves à aire constante soit par modification de la surface de l'interface où est formé le film dont le nombre de molécules reste constant. Ce second processus est obtenu à l'aide d'une barrière mobile en Teflon entraînée par un moteur électrique. Celle-ci sépare la surface de la cuve en deux compartiments, l'un dont l'interface est libre, l'autre où elle est recouverte par le film. Le déplacement de la barrière va diminuer la surface du second compartiment et par suite, l'aire par molécule des constituants de la monocouche. Cette grandeur est déterminée par une méthode analogique à l'aide d'un potentiomètre de recopie. La commande de celui-ci est asservie à l'aide d'une crémaillère à la position de la barrière mobile (192). Une tension de référence étant imposée pour la résistance totale, celle qui apparaît sur l'une des branches du potentiomètre est proportionnelle à la position de la barrière.

Les phospholipides (Sigma, USA) (purifiés par les Dr G. LANEELLE et J.F. TOCANNE de cet Institut) sont mis en solution dans le mélange de solvants

organiques (qualité pour spectroscopie, Prolabo, France) en proportion idoine.

L'interface air/eau de la solution aqueuse contenue dans la cuve est soigneusement nettoyée par succion à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à une trompe à vide. Cette opération permet l'élimination des poussières et des tensioactifs qui pourraient être présents à l'interface. Elle est répétée plusieurs fois.

Les couches monomoléculaires sont formées à l'interface par dépôt d'un volume connu de la solution organique de phospholipides par fractions successives de 1 μl chacune à l'aide d'une seringue à vis micrométrique (Agla, Angleterre).

Les mesures de tension de surface sont réalisées par la méthode de Wilhemny. La lame de platine (Prolabo, France) conservée dans le mélange sulfochromique est soigneusement rincée à l'eau ultra-pure (Motorola) puis placée à l'interface air/eau étant reliée à un dispositif de mesure. Ce dernier est soit une balance LM 600 (Beckman, USA) soit un dispositif adapté d'un capteur de déplacement (Chauvin-Arnoux, Ifelec, France) dont la résolution est inférieure à 0,2 $mN.m^{-1}$. Les mesures sont visualisées sur un enregistreur graphique.

ANNEXE 2

REALISATION DE MICROVESICULES

Deux méthodes sont utilisées au laboratoire :

- par sonication
- par injection.

I. PAR SONICATION

Une dispersion de phospholipides dans un tampon salin, soumise à un champ ultra-sonore se réorganise sur le plan structural sous la forme de micro-vésicules.

15 mg de phospholipides sont déposés dans un petit tube à essai. 200 µl de chloroforme (qualité spectroscopique) sont alors ajoutés pour obtenir une solution homogène de phospholipides. Les sondes fluorescentes sont alors ajoutées. Le solvant est alors éliminé par un jet d'azote, les phospholipides formant un film sur le fond du tube. Lorsque tout le solvant est évaporé, un volume de 2 ml de tampon, dégazé par barbotage d'azote, filtré sur filtre GSWP 04700 (Millipore, USA), est ajouté. Le contenu du tube est mis sous azote puis porté au-dessus de la température de transition, après que le tube ait été refermé par du parafilm (American can Co, USA). Après une agitation vigoureuse (manuelle, puis au Vortex), le tube est placé dans un bain à ultra-sons (Ultrasons, France) dont la cuve est remplie d'eau additionnée de Teepol. Le traitement aux ultra-sons est poursuivi jusqu'à l'obtention d'un mélange opalescent. Le contenu du tube est alors transféré dans un tube de centrifugeuse (Beckman 303-369). La centrifugation (Rotor Beckman Ti 50, Centrifugeuse L 50) est opérée à 4°C (40 000 tours/min, 10 mn). Les systèmes multilamellaires précipitent si bien que le surnageant contient une suspension homogène de microvésicules comme le révèlent les clichés de microscopie électronique (dus à la courtoisie de Mme GILLOIS).

La sonication à l'aide d'un générateur Branson (Branson, USA) muni de la "microtête" s'avère plus efficace mais provoque par l'érosion de la sonde la présence de petits fragments de titane dans la solution. Ces éléments métalliques jouent éventuellement le rôle de catalyseur d'oxydation dans la formation

de lysodérivés.

II. PAR INJECTION

L'injection rapide d'une solution éthanolique de phospholipides dans un tampon vigoureusement agité, placé à une température supérieure à la température de transition permet d'obtenir des microvésicules.

15 mg de phospholipides sont mis en solution dans 1 ml d'éthanol distillé contenant la concentration convenable en marqueurs fluorescents. Cette solution est rapidement injectée dans 20 ml de 0,1 M NaCl à l'aide d'une seringue (Hamilton 605 CH) équipée d'une aiguille de petit diamètre (Yale 27, Hamilton, USA). Les systèmes multilamellaires sont éliminés par centrifugation (24 000 g, centrifugeuse JOUAN K 63 F, 15 minutes, 4°C)(Jouan, France). L'excès d'éthanol subsistant dans le surnageant est alors éliminé par dialyse (4°C, 12 heures).

ANNEXE 3

REALISATION DE FILMS NOIRS

La technique décrite ci-dessous nous a été transmise par le Dr. POHL lors d'un séjour à l'Université de Constance. Qu'il soit remercié pour les multiples conseils qu'il nous a prodigués à cette occasion.

Le support en Teflon est soigneusement nettoyé (détergent, rincage, éthanol), puis mis en place en diagonale dans une cuve de spectroscopie (20 x 20 mm). La cuve est alors remplie avec le milieu choisi. Le phospholipide (dierucoyllecithin) est mis en solution (10 mg/mL) dans un mélange organique (hexane-decane 10-1). Une faible quantité (quelques μl) est prélevée à l'aide d'une seringue munie d'un embout souple, déposée sur la base de la fenêtre percée dans le support en Teflon (Ø = quelques mm). Ce dépôt est rapidement étalé sur la fenêtre à l'aide de l'embout souple, formant un dépôt initialement multilamellaire. Observé à la lunette, ce dernier présente un aspect irisé qui va devenir noir au bout de 10 minutes. Ce phénomène se déclenche par la base. Lorsque toute la fenêtre est noire, le film noir est formé. Le contrôle de son existence lors des mesures de fluorescence s'effectue par la détermination de ses caractéristiques électriques (résistance, capacité).

ANNEXE 4

SPECTROPHOTOFLUORIMETRIE DE RELAXATION THERMIQUE

La réalisation de cet appareil a bénéficié des informations acquises grâce à la R.C.P. "Cinétiques rapides " du C.N.R.S. La réalisation pratique des pièces de mécanique a été effectuée à l'atelier de physique de l'Université Paul Sabatier. La partie électronique a été entièrement réalisée par Mr. CARRERE, (de cet Institut) par adaptation de schémas obtenus dans le cadre de la RCP citée ci-dessus.

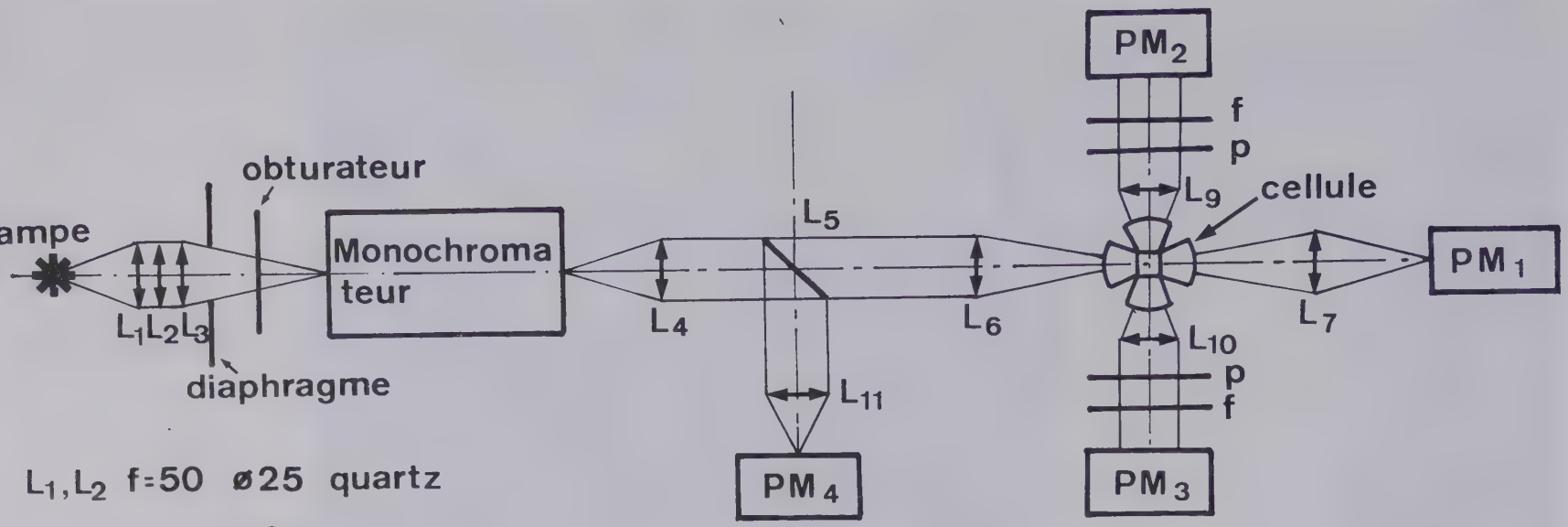
L'appareil utilise les idées de base décrites par le groupe du Pr. EIGEN (189), avec des modifications qui ont affecté essentiellement l'optique, certaines pièces de mécanique et l'électronique comme déjà énoncé. Un système d'acquisition de données, original lors de sa réalisation (1974), a été couplé au système de mesure.

La recherche d'une optimisation du rapport signal sur bruit a été le facteur essentiel de notre étude. Dans ce but, l'optique a été calculée pour assurer d'une part l'illumination la plus intense de l'échantillon, et d'autre part, la collection la plus efficace de la lumière transmise ou réémise. Ce choix est une application directe des lois des processus aléatoires dont le bruit électronique est un exemple. Le rapport signal sur bruit est, pour un appareil donné, proportionnel à la racine carrée du signal :

$$\frac{S}{B} = k\sqrt{S}$$

La limite d'un tel choix est imposée par la photosensibilité du produit étudié.

Les sources lumineuses utilisées sont des dispositifs à faible puissance mais à haute luminosité (HBO 100 W., XBO 75 W., OSRAM, Allemagne). La lumière émise est reprise par l'ensemble des 3 lentilles L_1, L_2 (quartz naturel) et L_3 (suprasil) pour être focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur (Jarell-Ash, 83410, USA) avec une ouverture du faisceau de f/4, imposée par le monochromateur. Après traversée de ce dispositif, la lumière est reprise par L_4 (suprasil) qui en donne un faisceau sensiblement parallèle dont une partie est réfléchie par la lame L_5 (suprasil). La lumière transmise est focalisée par

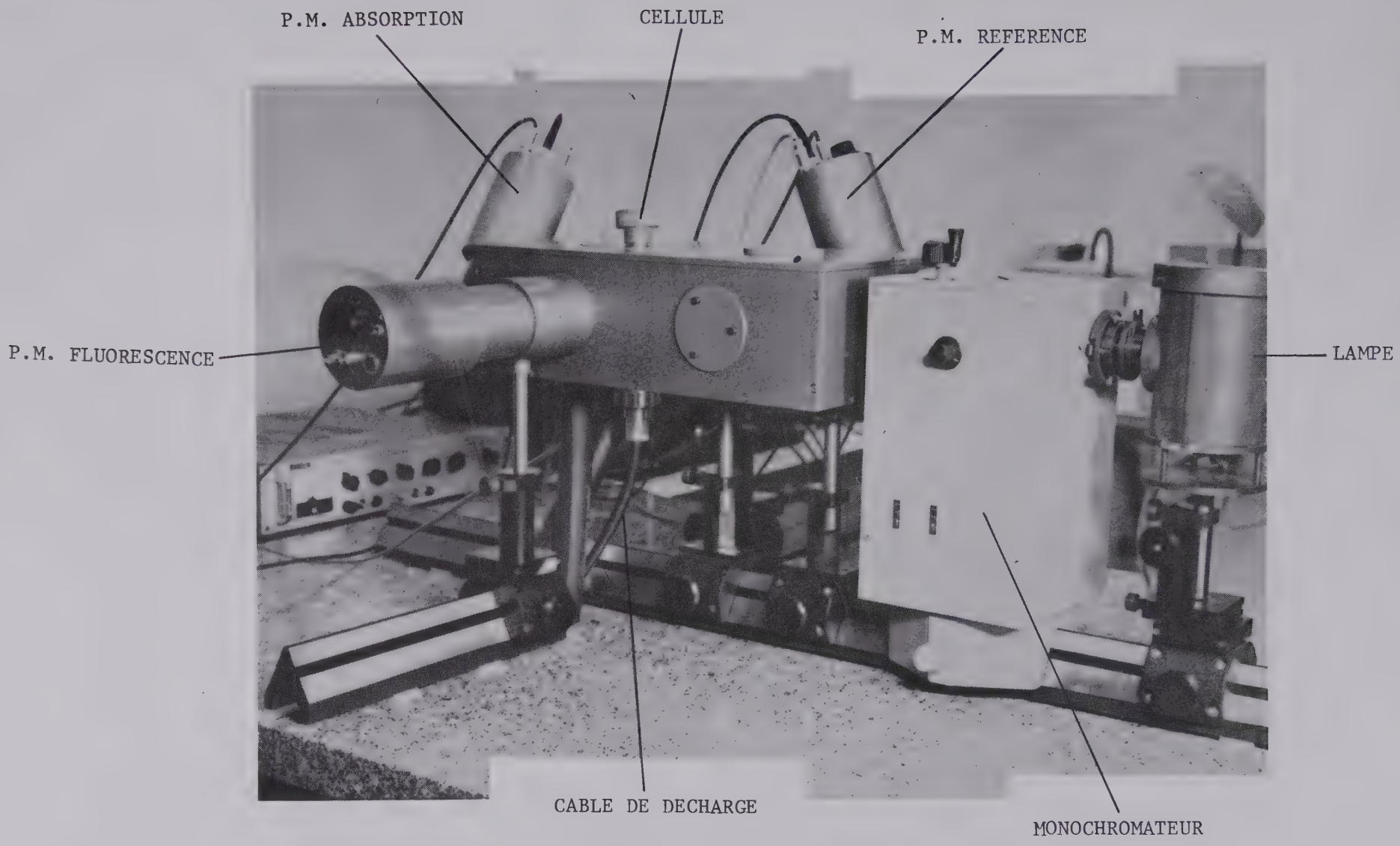


L_1, L_2	f=50	ø25	quartz
L_3	f=77	ø25	-
L_4	f=50	ø20	suprasil
L_5	lame plane		-
L_6	f=75	ø25	-
L_7	f=50	ø25	-
L_9, L_{10}	f=50	ø42	-
L_{11}	f=150	ø20	-

schéma de l'optique

Spectrophotofluorimétre de relaxation thermique

Planche 1



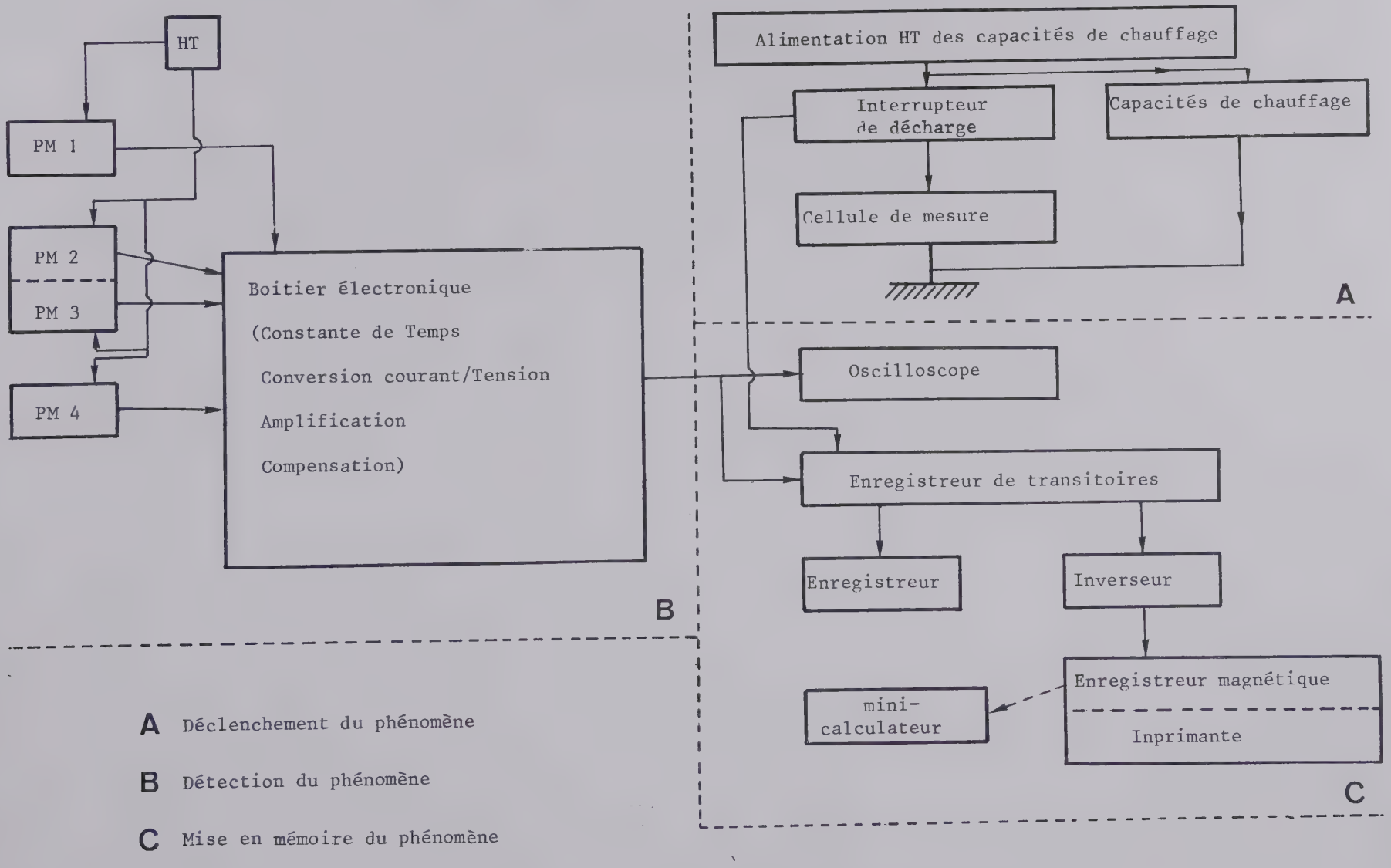
SPECTROPHOTOFLUORIMETRE DE RELAXATION THERMIQUE : Vue générale

L_6 (suprasil) au milieu de la cellule de mesure (Messanlagen, Allemagne). Pour les expériences où sont déterminées des variations de lumière transmise, la lumière, après traversée de la cellule est reprise par L_7 (suprasil) et focalisée sur la photocathode du photomultiplicateur PM 1 (EMI 9783, Angleterre). Pour les expériences où sont mesurées les variations du signal de fluorescence, le flux incident se réfléchit sur le miroir L_8 et retraverse la solution. La lumière réémise est reprise par L_9 (suprasil) qui en donne un faisceau de lumière sensiblement parallèle. Celui-ci traverse le filtre F qui sélectionne en longueur d'onde la lumière réémise et, éventuellement, le polariseur P (Polaroïd, USA). Le flux lumineux est alors mesuré par le photomultiplicateur PM 2 (PM 3) (EMI 9558 QA, Angleterre). La fluorescence étant observée à 90° de la direction d'incidence, deux directions d'observation équivalentes existent et sont utilisées pour améliorer le rapport signal sur bruit ; les deux signaux obtenus sont sommés au niveau de l'électronique, alors que le bruit, processus aléatoire, n'apparaît que sous la forme de la racine carrée de la somme des carrés des bruits. Les deux voies de mesure étant équivalentes, donc délivrant même signal et même bruit, le rapport signal sur bruit est amélioré d'un facteur égal à racine de 2.

La lumière déviée par la lame L_6 est utilisée pour compenser les fluctuations de source lumineuse. A cette fin, elle est reprise par L_{11} (suprasil) pour être focalisée sur la photocathode du photomultiplicateur de référence PM 4 (EMI 9783, Angleterre). Le signal délivré par ce dernier compense le signal de mesure au niveau de l'électronique par la classique méthode de zéro.

Pour d'éventuelles mesures en polarisation de fluorescence, l'ensemble $L_5 + L_7$ doit être remplacé par L_{12} (suprasil) et un prisme de Glan. Ce dernier dispositif permet un éclairement de l'échantillon par une lumière linéairement polarisée et sous des conditions d'ouverture du faisceau de f/10. Ce dernier paramètre est exigé par les mesures de polarisation (190, 191). Des fentes rectilignes, à axe horizontal, placées dans l'optique d'observation, limitent son ouverture à f/10 pour répondre au même critère. L'analyse est effectuée à l'aide des polariseurs P.

Les photomultiplicateurs ont été choisis en raison de leur large réponse spectrale (photocathode S 5 et S 20 étendu, fenêtre en quartz) et de leur bonne sensibilité (en particulier pour les mesures de fluorescence). Ils sont protégés des perturbations électrostatiques par un blindage et des perturbations électromagnétiques par un deuxième blindage en µmétal (EMI PS 5 B, Angleterre) pour PM 2 et PM 3. En effet, seuls les tubes à photocathode en bout sont sensibles à ce facteur.



SCHEMA DE PRINCIPE DE L'ELECTRONIQUE DE MESURE

Le boitier électronique assure le traitement analogique de l'information (sommation, compensation des fluctuations par méthode de zéro, choix des constantes de temps). Ce dernier paramètre est ajustable séparément pour les voies mesure et référence. Ceci permet d'optimiser le rapport signal sur bruit qui varie comme l'inverse de la constante de temps de l'électronique.

La visualisation peut être obtenue soit classiquement sur l'écran d'un oscilloscope à mémoire (Tektronix 7313, 7 A 15 A, 7 B 50, USA) soit dans un enregistreur de phénomènes transitoires (Datalab DL 905, Angleterre). L'information peut être visualisée soit sur un enregistreur graphique, soit sur une imprimante (Texas, ASR 33, USA). Le couplage avec ce dernier périphérique s'effectue à l'aide d'un inverseur (Sesco SFC 416, France). Parallèlement à l'impression, les résultats peuvent être enregistrés sur des cassettes magnétiques. L'information contenue dans ces dernières peut être transférée au minicalculateur (Wang 2200 B, USA) grâce à un programme mis au point par Mr. TICHADOU

ANNEXE 5

FLUORIMETRE DES INTERFACES

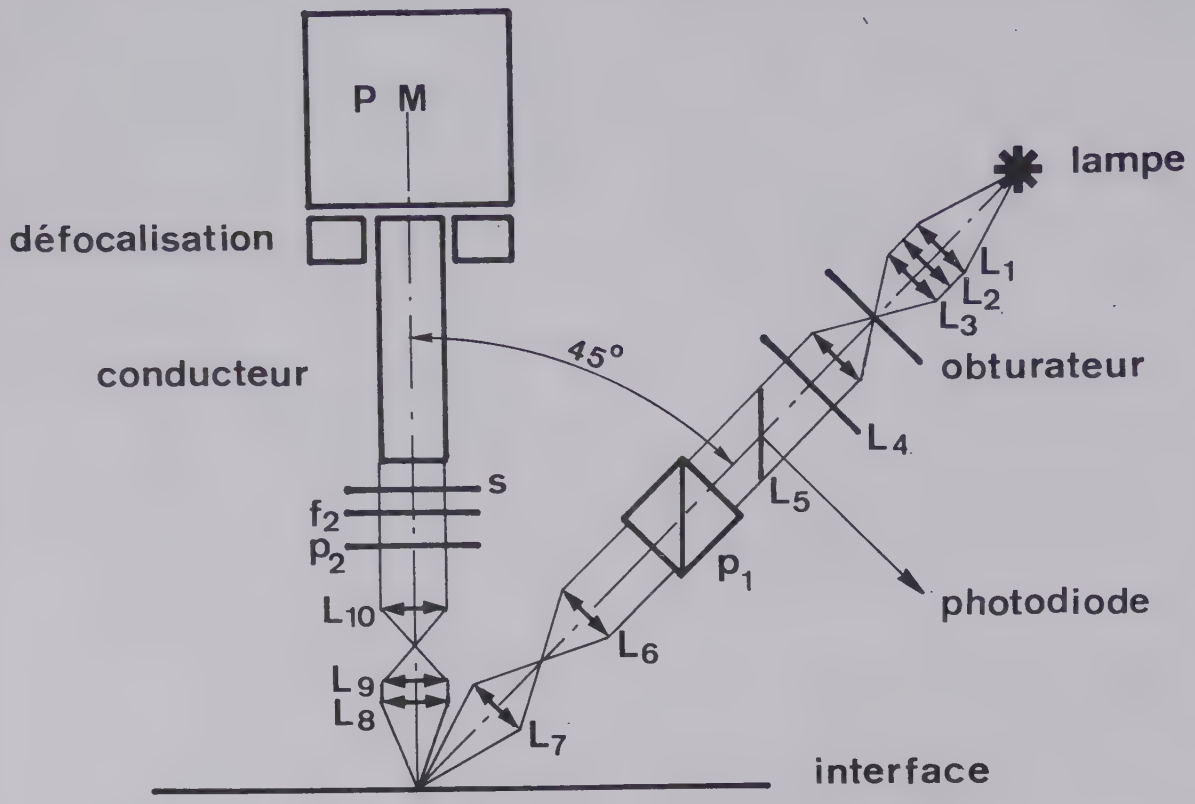
La lumière émise par la source (HBO 100 W/2, XBO 75 W, OSRAM, Allemagne) est reprise par le collecteur formé de L_1L_2 (quartz) et L_3 (suprasil) puis de L_4 (suprasil) pour en donner un faisceau parallèle (toutes les pièces d'optique sont d'origine Fichou, France). Entre L_3 et L_4 est placé l'obturateur qui protège la préparation en dehors des temps de mesure. Le faisceau de lumière parallèle traverse le filtre d'excitation F_1 (éventuellement interférentiel), la lame semi-réfléchissante L_5 et le prisme de Glan P_1 (Halle, Allemagne). L'ensemble L_6 et L_7 (suprasil) le focalise sur le plan de l'interface.

L'optique d'observation est constituée des lentilles L_8, L_9 (quartz) et L_{10} (suprasil). Cet ensemble permet d'obtenir un faisceau de lumière parallèle qui traverse le filtre F_2 (éventuellement interférentiel) et l'analyseur P_2. Il est alors repris par le conducteur rigide de lumière (Schott, Allemagne) qui le transmet à la photocathode du détecteur PM (EMI 9558 QA, Angleterre). Le bruit noir de ce dernier est réduit par l'emploi d'un anneau de défocalisation magnétique (EMI C122,Angleterre) et d'un dispositif de refroidissement portant la photocathode aux environs de 5°C. Son emploi réduit le courant noir d'un facteur plus grand que 10 mais nécessite l'utilisation d'un balayage d'azote pour éliminer les effets de la condensation.

Le tube est cablé en générateur de courant.

Le signal traverse alors :

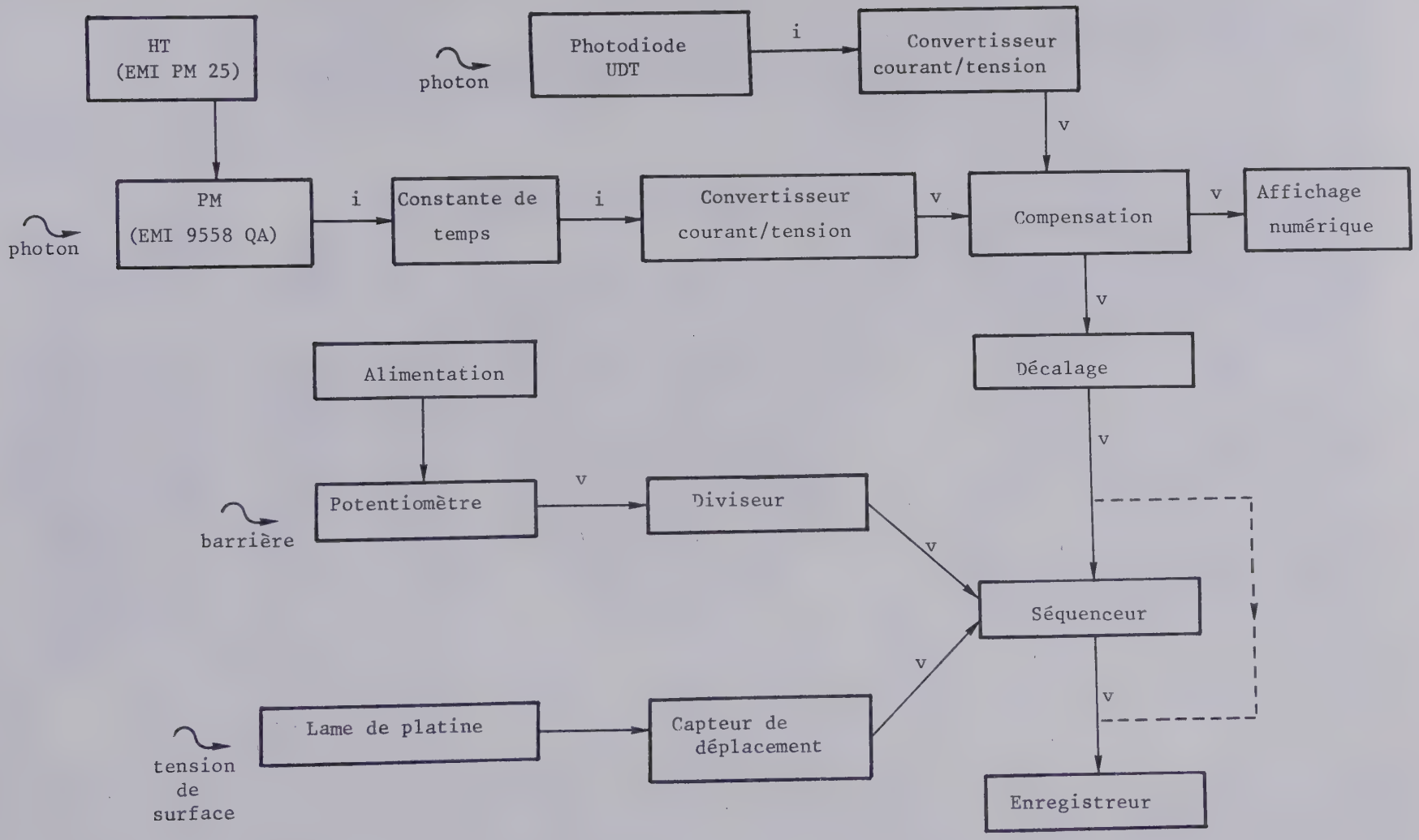
1) un étage de filtrage (1) qui par allongement de la constante de temps réduit le bruit électronique associé au signal
2) un convertisseur courant/tension (2) à gain variable
3) un étage de compensation du courant noir (3) couplée éventuellement à une compensation des fluctuations de source. A cet effet, le faisceau incident est partiellement réfléchi par la lame L_5 et est détecté par la photodiode D (UDT, USA). Le courant que délivre cette dernière est converti en une tension proportionnelle au flux incident. Une division analogique de la tension de mesure par cette tension référence permet de s'affranchir des fluctuations de source (Analog Devices, USA).



L_1, L_2	f=50	ø=25	quartz
L_3	f=33	ø=25	-
L_4	f=11	ø=9	suprasil
L_5	lame plane		-
L_6	f=25	ø=9	-
L_7	f=8	ø=7	-
L_8, L_9	f=10	ø=9	quartz
L_{10}	f=20	ø=6	suprasil

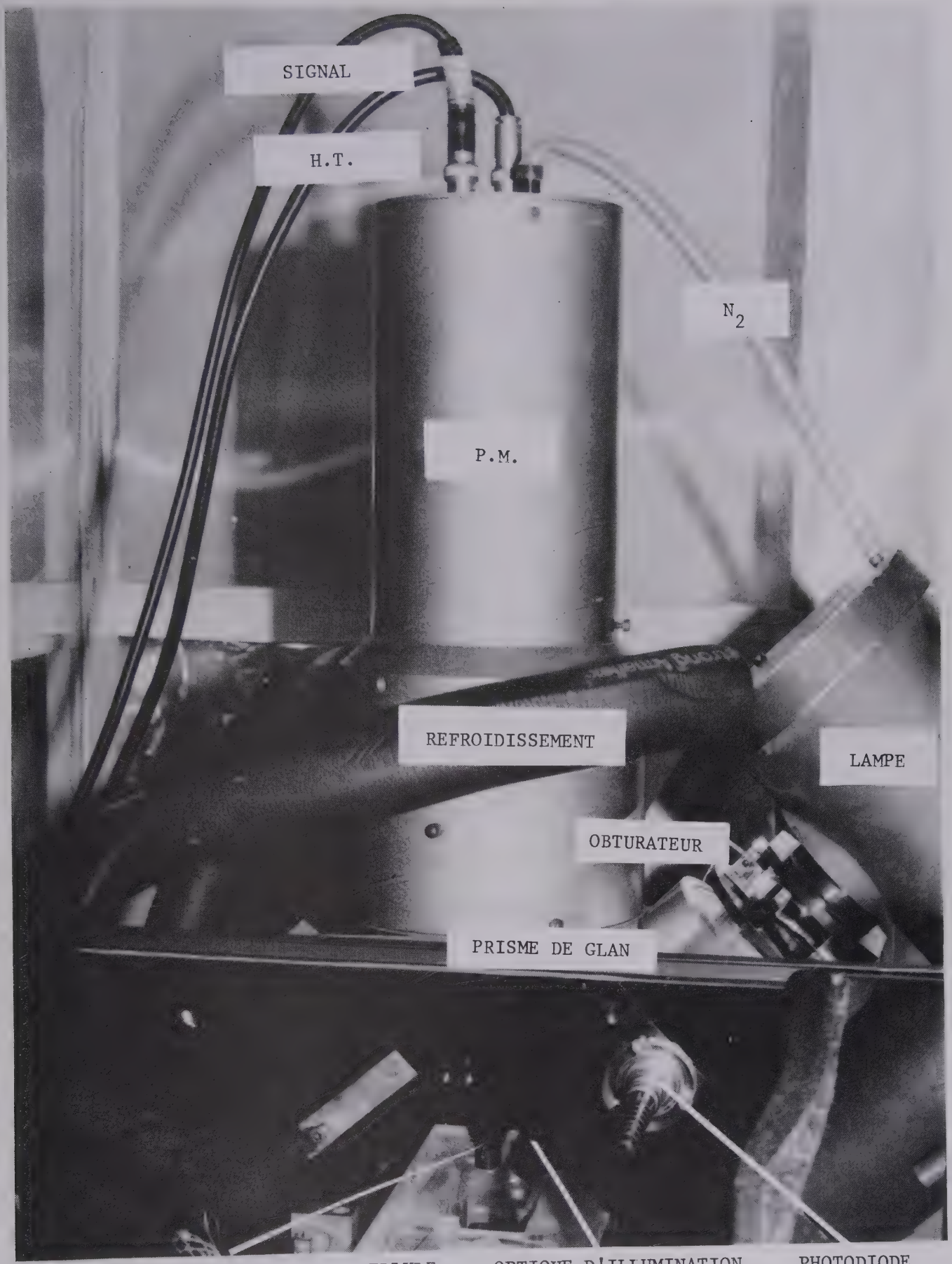
schéma de l'optique

Fluorimétre des Interfaces



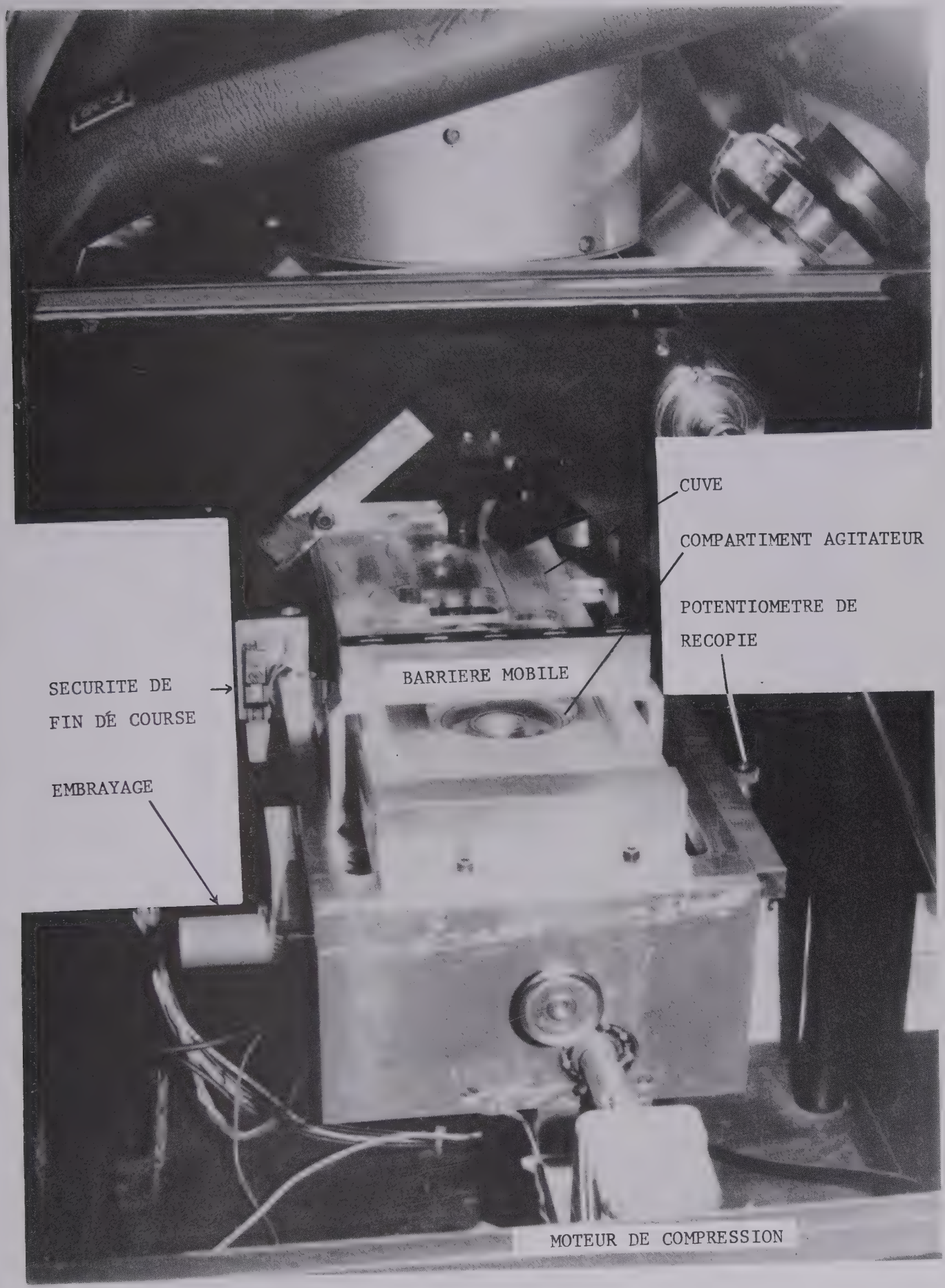
SCHEMA DE PRINCIPE DE L'ELECTRONIQUE DE MESURE

FLUORIMETRE DES INTERFACES:Vue d'ensemble

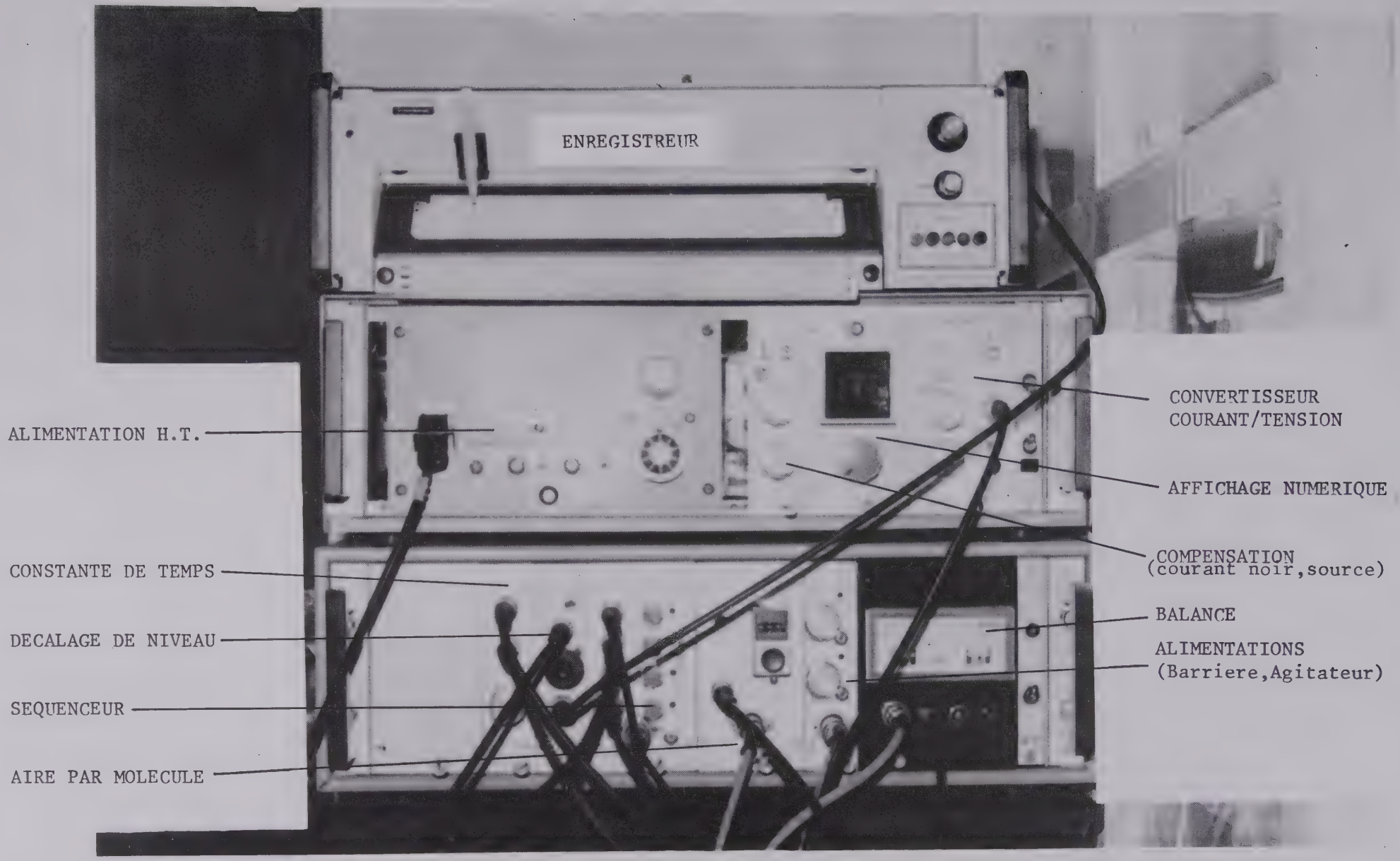


FLUORIMETRE DES INTERFACES : Ensemble de mesures

Planche 3



FLUORIMETRE DES INTERFACES : Cellule de compression des monocouches



FLUORIMETRE DES INTERFACES:Partie Electronique

4) un étage de décalage de niveau (4). Il est possible de compenser par ce biais le signal associé à la lumière diffusée et à l'effet Raman.
5) un séquenceur (5) : les grandeurs : fluorescence, tension de surface, aire par molécule sont échantillonées de façon séquencée.
6) un enregistreur (6) (Heathkit Schlumberger, USA) où le signal est visualisé. Nous notons qu'une visualisation sur affichage numérique (7) (Schlumberger, France) existe au niveau de (3).

Le traitement par l'étage (5) peut éventuellement être supprimé lors des expériences à aire constante.

L'appareil peut éventuellement recevoir d'autres applications que l'étude de la fluorescence de couches moléculaires. Des résultats intéressants sont obtenus dans les mesures de :

1) fluorescence de solutions diluées (10^{-12} M de sulfate de quinine dans H_2SO_4 0,1 N)
2) lecture de plaques de chromatographie en couches minces (par mesure de lumière diffusée)
3) lecture de gels d'électrophorèse en tube ou en plaque (par mesure de lumière diffusée ou de fluorescence).

Pour ces dernières applications, la résolution spatiale du dispositif est améliorée par le montage de diaphragmes rectangulaires S au niveau de F_2.

L'aide de Mr. G. JOSEPH m'a été précieuse pour la réalisation des photographies de ce mémoire.

ANNEXE 6

CALCUL DE SIMULATION DE L'ORIENTATION DU PLAN DE L'HEME

Ce programme (langage BASIC) permet le calcul de l'inhibition par transfert de Perrin pour les divers orientations du plan de l'heme du cytochrome c. Les variables suivantes permettent de paramétrer notre calcul :

D orientation du moment d'émission du donneur

B distance entre les axes perpendiculaires au plan de la membrane passant par le donneur et par le centre de la sphère à laquelle est assimilé le cytochrome

N (7,5 - N) (Å) est la pénétration du cytochrome c dans le feuillet.

A orientation du moment d'absorption de l'accepteur (heme).

```
1000SELECT PRINT 01D
1010 D=ARCCOS(.764)
1020 L=10.5
1030 G=15.5
1040 FOR B=1TO (2*G+1)
1050 B=B-1
1060 FOR N=1TO 6
1070 N=N-1
1080 N=N/2
1090 PRINT TAB(5);"B=";B;"N=";N
1100 FOR J=1TO 50
1110PRINT "+";
1120 NEXT J
1130 PRINT "+"
1140 FOR I=1TO 60
1150 A=3*I*#PI/180
1160 U=B^2+L^2+N^2+G^2-2*L*COS(A)*(N+G)+2*N*G
1170 Z=(-3/U)*L*SIN(A)*SIN(D)*B*SIN(A)
1180 Y=SIN(A)*SIN(D)*(1-(3/U)*L*((G+N)*COS(A)-L*COS(2*A)))
1190 X=(-3/U)*B*B*SIN(A)*SIN(D)
1200 W=(-3/U)*B*SIN(D)*((G+N)*COS(A)-L*COS(2*A))
1210 V=(-3/U)*B*SIN(A)*((G+N)*COS(D)-L*COS(A)*COS(D))
1220 S=COS(A)*COS(D)-(3/U)*((G+N)*COS(D)-L*COS(A)*COS(D))*((G+N)*COS(A)-
     'L*cos(2*A)
1230 M=.25*(Z^2)+.5*(Y^2)+.25*(X^2)+.5*(W^2)+.5*(V^2)+S^2+X*Y/2
1240 P=EXP((1/6)*LOG(M))
1250 T=U^.5
1260 E=U
1270 F=.5*(2*B*L*SIN(A))^2
1280 H=E^3+3*E*F
1290 K=H^(1/6)
1300PRINT TAB(5);INT(A*180/#PI);INT(100*(K^6)/((K^6)+(36.9*P)^6))
1310 NEXT I
1320 N=2*N
1330 N=N+1
1340 NEXT N
1350 B=B+1
1360 NEXT B
1370 END
```

BIBLIOGRAPHIE

1 - "Cell Membranes", G. WEISSMANN et R. CLAIBORNE
H.P. Publishing Co, New York

2 - "La Cellule", M. DURAND et P. FAVARD
Herrmann, Paris

3 - "Molecular Biophysics", M.V. VOLKENSTEIN
Academic Press, New York

4 - M. ALBRING, J. GRIFFITH et G. ATTARDI
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1977), 74, 1348-1352

5 - HODGKIN
"The conduction of the nervous impulse", Liverpool

6 - J.K. RAISON, J.M. LYONS et W.W. THOMSON
Arch. Biochem. Biophys. (1974), 142, 83-90

7 - J.K. RAISON, J.M. LYONS, R.J. MEHLHORN et A.D. KEITH
J. Biol. Cell. (1971), 246, 4036-4040

8 - S.W. de LAAT, P.T. VAN DER SAAG, S. AD NELEMANS et M. SHINITZKI
Biochim. Biophys. Acta (1978), 509, 188-193

9 - S.W. de LAAT, P.T. VAN DER SAAG et M. SHINITZKI
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1977), 74, 4458-4461

10 - R. COLEMAN
Biochim. Biophys. Acta (1973), 300, 1-30

11 - A. HELENIUS et K. SIMONS
Biochim. Biophys. Acta (1975), 415, 29-79

12 - C. TANFORD et J.A. REYNOLDS
Biochim. Biophys. Acta (1976), 457, 133-170

13 - S.L. GOODMAN, M. ISERN DE CALDENTEY et K.P. WHEELER
Biochem. J. (1978), 169, 305-311

14 - T. OMURA et S. TAKESUE
J. Biochem.(Tokyo) (1970), 67, 249-257

15 - L. SPATZ et P. STRITTMATTER
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1971), 68, 1042-1046

16 - J. OZOLS
Biochemistry (1974), 13, 426-434

17 - L. VISSER, N.C. ROBINSON et C. TANFORD
Biochemistry (1975), 14, 1194-1199

18 - S. RAZIN
Biochim. Biophys. Acta (1972), 265, 241-296

19 - Y. KAGAWA
Biochim. Biophys. Acta (1972), 265, 297-338

20 - GORTEL et GRENDEL
J. Exp. Med. (1925), 41, 439

21 - DAVSON et DANIELLI
"Permeability of natural membranes" (1952), Cambridge University Press, Londres

22 - ROBERTSON
Protoplasma (1967), 63, 218

23 - A.M. GLAUERT et J.A. LUCY
"The membranes" (1968) p. 1, Academic Press, New York et Londres

24 - BENSON
J. Am. Oil Chem. Soc. (1966), 43, 265

25 - D. W. DEAMER
Bioenergetics (1970), 1, 237

26 - P. BOTHOREL et C. LUSSAN
C.R. Acad. Sci. (1968), 266, 2492

27 - S.J. SINGER et G.L. NICHOLSON
Science (Wash. D.C.) (1972), 175, 720

28 - G. VANDERKOOI et D.E. GREEN
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1970), 66, 615

29 - P. JOST, O.H. GRIFFITH, R.A. CAPALDI et G. VANDERKOOI
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1973), 70, 480

30 - J. DAVOUST et P.F. DEVAUX
Abstracts du VI° Congrès International de Biophysique (1978), Kyoto, IV - 2 - (510) p. 174

31 - J.K. BLASIE et C.R. WORTHINGTON
J. Mol. Biol. (1969), 39, 417

32 - KEYNES, COHEN et HILLE
Nature (1968), 210, 438

33 - R. AZERAD et E. LEDERER
"Biochimie des Lipides" (1973), Ediscience, Paris

34 - G.L. GAINES
"Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces", Ediscience, New York

35 - D.G. DERVICHIAN
"Progress in the chemistry of fats and other lipids", p. 193-242 (1954), Pergamon, Londres

36 - J.A. DE FEIJTER, J. BENJAMINS et F.A. VEER
Biopolymers (1978), 17, 1759-1772

37 - A.G. TWEET, G.L. GAINES et W.D. BELLAMY
J. Chem. Phys. (1964), 40, 2596-2600

38 - A.G. TWEET, G.L. GAINES et W.D. BELLAMY
J. Chem. Phys. (1964), 41, 1008-1010

39 - A.G. TWEET, W.D. BELLAMY et G.L. GAINES
J. Chem. Phys. (1964), 41, 2068-2077

40 - T. TROSPER, R.B. PARK et K. SAUER
Photochem. Photobiol. (1968), 7, 451-469

41 - R. AOSHIMA, K. IRIYAMA et H. ASAI
Applied Optics (1973), 12, 2748-2750

42 - R. AOSHIMA, K. IRIYAMA et H. ASAI
Biochim. Biophys. Acta (1975), 406, 362-369

43 - A. TENENBAUM, C. BERLINER, J.M. RUYSSCHAERT et J. JAFFE
J. Colloid. Interf. Sci. (1976), 56, 360-364

44 - A.D. BANGHAM
Ann. Rev. Biochem. (1972), 41, 753

45 - H.J. HINZ et J.M. STURTEVANT
J. Biol. Chem. (1972), 247, 6071-6075

46 - A. KOTYK et K. JANACEK
"Biomembranes - 9" (1977), Plenum Press, New York et Londres

47 - H.C. ANDERSEN
Ann. Rev. Biochem. (1978), 47, 359-383

48 - C. GEBHARDT, H. GRULER et E. SACKMANN
Z. Naturforsch, 32 c (1977), 581-596

49 - C.H. HUANG
Biochemistry (1969), 8, 344-351

50 - W.D. SEUFERT
Biophysik (1970), 7, 60-73

51 - S. BATZRI et E.D. KORN
Biochim. Biophys. Acta (1973), 298, 1015-1019

52 - J.M.H. KREMER, M.W.J. v.d. ESKER, C. PATHMAMANOHARAN et P.H. WIERSEMA
Biochemistry (1977), 16, 3932-3935

53 - J. BRUNNER, P. SKRABAL et H. HAUSER
Biochim. Biophys. Acta (1976), 455, 322-331

54 - D. DEAMER et A. BANGHAM
Biochim. Biophys. Acta (1976), 443, 629-634

55 - F. SZOKA et D. PAPAHADJOPOULOS
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(1978), 75, 4194-4198

56 - K.J. LONGMUIR et F.W. DAHLQUIST
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1976), 73,2716-2719

57 - A. WATTS, D. MARSH et P.F. KNOWLES
Biochemistry (1978), 17, 1792-1801

58 - A. CHRZESZCZYK, A. WISHNIA et C.S. SPRINGER
Biochim. Biophys. Acta. (1977), 470, 161-169

59 - C. HUANG et J.T. MASON
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(1978), 75, 308-310

60 - D. PAPAHADJOPOULOS, K. JACOBSON, S. NIR et T. ISAC
Biochim. Biophys. Acta (1973), 311, 330-348

61 - T.Y. TSONG
Biochemistry (1975), 14, 5409-5414

62 - T.Y. TSONG
Biochemistry (1975), 14, 5415-5417

63 - T.Y. TSONG, M. GREENBERG et M.I. KANEHISA
Biochemistry (1977), 16, 3115-3121

64 - H. TI TIEN
"Bilayer lipid membranes" (1974), Dekker, New York

65 - A. PAGANO, J.M. RUYSSCHAERT et I.R. MILLER
J. Memb. Biol. (1972), 10, 11-30

66 - A. STEINEMANN et P. LAUGER
J. Memb. Biol. (1971), 4, 74-86

67 - E. SMEKAL, H.P. TING, L.G. AUGENSTEIN et H. TI TIEN
Science (1970), 168, 1108-1109

68 - N. ALAMUTI et P. LAUGER
Biochim. Biophys. Acta (1970), 211, 362

69 - G.W. POHL, G. STARK et H.W. TRISSL
Biochim. Biophys. Acta (1973), 318, 478-481

70 - G.W. POHL
Biochim. Biophys. Acta (1972), 288, 248-253

71 - A. AZZI
Q. Rev. Biophys. (1975), 8, 237-316

72 - A.A. THAER et M. SERNETZ
"Fluorescence techniques in cell biology" (1973), Springer, Berlin

73 - R.F. CHEN et H. EDELHOCH
"Biochemical fluorescence : concepts", Dekker, New York

74 - G.K. RADDA et J. VANDERKOOI
Biochim. Biophys. (1972), 265, 509-549

75 - A. AZZI
"Methods in Enzymology" XXXII (1974), 234-246, Academic Press, New York

76 - A.J. PESCE, C.G. ROSEN et T.L. PASBY
"Fluorescence spectroscopy" (1971), Dekker, New York

77 - J. BARRIOL et J.L. RIVAIL
"Spectroscopies de la molécule", P.U.F., Paris

78 - G.K. RADDA
Biochem. J. (1971), 122, 385-396

79 - L. STRYER
J. Mol. Biol. (1965), 13, 482

80 - G. OSTER et Y. NISHIJIMA
Fortschr. Hochpolym. Forsch.(1964), 3, 313-331

81 - R.F. CHEN
Arch. Biochem. Biophys.(1977), 179, 672-681

82 - J.PERRIN
J. Phys. Rad. (1926), 7, 390

83 - J. PERRIN
Ann. Phys. (1929), 12, 169

84 - G. WEBER
Adv. Protein Chem. (1953), 8, 415

85 - G. WEBER
Biochem. J. (1952), 51, 145-154

86 - J. YGUERABIDE
"Methods in Enzymology" XXVI, 498-577, Academic Press, New York

87 - K. KINOSITA, S. KAWATO et A. IKEGAMI
Biophys. J. (1977), 20, 289-305

88 - P. GLATZ
Anal. Biochem. (1978), 87, 187-194

89 - J.R. LAKOWICZ et F.G. PRENDERGAST
Science (1978), 200, 1399-1401

90 - Y. NISHIJIMA
J. Polym. Sci. (1970), 31, 353-373

91 - J. YGUERABIDE et L. STRYER
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1971), 68, 1217-1221

92 - C.R. DESPER et I. KIMURA
J. Appl. Phys. (1967), 38, 4225-4233

93 - R. A. BADLEY, H. SCHNEIDER et W.G. MARTIN
Biochim. Biophys. Res. Comm. (1971), 45, 174-183

94 - R.A. BADLEY, W.G. MARTIN et H. SCHNEIDER
Biochemistry (1973), 12, 268-275

95 - E. FREHLAND et H.W. TRISSL
Biochim. Biophys. Acta (1975), 21, 147-173

96 - E. FREHLAND
Z. Naturforsch. (1975), 30 a, 1241-1246

97 - E. FREHLAND
Biophys. Chem. (1976), 4, 65-78

98 - F. PERRIN
Ann. Chim. Phys. (1932), 17, 283

99 - G. WEBER et F.W.J. TEALE
Disc. Faraday Soc. (1959), 27, 134

100 - G. WEBER et E. DANIEL
Biochemistry (1966), 5, 1900

101 - S.A. LATT, H.T. CHEUNG et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1965), 87, 995

102 - L. STRYER
Ann. Rev. Biochem. (1978), 47, 819-846

103 - B. CHANCE et V. LEGALLAIS
Rev. Sci. Inst. (1959), 30, 732-741

104 - P. VIGNY et M. DUQUESNE
Photochem. Photobiol. (1974), 20, 15-25

105 - P. VIGNY et A. FAVRE
Photochem. Photobiol. (1974), 20, 345-349

106 - L. CHINSKY, P.Y. TURPIN et M. DUQUESNE
C.R. Acad. Sci.Paris (1974), 279, 1483-1486

107 - A.K. SKOUTAR, H.J. POWNALL, A.S. HU et L.C. SMITH
Biochemistry (1974), 13, 2828-2836

108 - H.J. GALLA et E. SACKMANN
Biochim. Biophys. Acta (1974), 339, 103-115

109 - J.M. VANDERKOOI et J.B. CALLIS
Biochemistry (1974), 13, 4000-4006

110 - A.S. WAGGONER et L. STRYER
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1970), 67, 579-589

111 - M.C. PHILLIPS, D.E. GRAHAM et H. HAUSER
Nature (1975), 254, 154-155

112 - H. TRAUBLE et D.H. HAYNES
Chem. Phys. Lipids (1971), 7, 324-336

113 - M.J. JANIAK, D.M. SMALL et G.G. SHIPLEY
Biochemistry (1976), 15, 4575-4580

114 - H.U. GALLY, W. NIEDERBERGER et J. SEELIG
Biochemistry (1975), 14, 3647-3652

115 - P.W.M. VAN DIJCK, B. DE KRUIJFF, P.A. M.M. AARTS, A.J. VERKLEIJ et J. DE GIER
Biochim. Biophys. Acta (1978), 506, 183-191

116 - A. WATTS, D. MARSH et P.F. KNOWLES
Biochemistry (1978), 17, 1792-1801

117 - M.P. ANDRICH et J.M. VANDERKOOI
Biochemistry (1976), 15, 1257-1261

118 - B.R. LENTZ, E. FREIRE et R.L. BILTONEN
Biochemistry (1978), 17, 4475-4480

119 - B.R. LENTZ, Y. BARENHOLZ et T.E. THOMSON
Biochemistry (1976), 15, 4521-4528

120 - B.R. LENTZ, Y. BARENHOLZ et T.E. THOMSON
Biochemistry (1976), 15, 4529-4537

121 - J.SUURKUUSK, B.R. LENTZ, Y. BARENHOLZ, R.L. BILTONEN et T.E. THOMSON
Biochemistry (1976), 15, 1393-1401

122 - J.F. FAUCON et C. LUSSAN
Biochim. Biophys. Acta (1973), 307, 459-466

123 - H. TRAUBLE et P. OVERATH
Biochim. Biophys. Acta (1973), 307, 491-512

124 - J.M. VANDERKOOI et B. CHANCE
FEBS Lett. (1972), 22, 23-26

125 - C. LUSSAN et J.F. FAUCON
FEBS Lett. (1971), 19, 186-188

126 - D. PAPAHADJOPOULOS, K. JACOBSON, S. NIR et T. ISAC
Biochim. Biophys. Acta (1973), 311, 330-348

127 - P. OVERATH et H. TRAUBLE
Biochemistry (1973), 12, 2625-2634

128 - K. JACOBSON et D. PAPAHADJOPOULOS
Biophys. J. (1976), 16, 549-559

129 - F. SCHROEDER, J.F. HOLLAND et P.R. VAGELOS
J. Biol. Chem. (1976), 251, 6739-6746

130 - S. MITAKU, A. IKEGAMI et A. SAKANISHI
Biophys. Chem. (1978), 8, 295-304

131 - M.B. ABRAMSON
Biochim. Biophys. Acta (1971), 225, 167-170

132 - O. AVRAMOVIC-ZIKIC et K. COLBOW
Biochim. Biophys. Acta (1978), 512, 97-102

133 - N. YELLIN et I.W. LEVIN
Biochim. Biophys. Acta (1977), 468-490-494

134 - B.P. GABER, P. YAGER et W.L. PETICOLAS
Biophys. J. (1978), 21, 161-176

135 - N. ALBON et J.M. STURTEVANT
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978), 75, 2258-2260

136 - T. GULIK-KRZYWICKI, E. SHECHTER, M. IWATSUBO, J.L. RANCK et V. LUZZATI
Biochim. Biophys. Acta (1970), 219, 1-10

137 - W. LESSLAUER, J.E. CAIN et J.K. BLASIE
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1972), 69,1499-1503

138 - D.H. HAYNES et H. STAERK
J. Memb. Biol. (1974), 17, 313-340

139 - D.H. HAYNES
J. Memb. Biol. (1974), 17, 341-366

140 - T.Y. TSONG
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1974), 71, 2684-2688

141 - T.Y. TSONG et M.I. KANEHISA
Biochemistry (1977), 16, 2674-2680

142 - J.D. OWEN, P. HEMMES et E.M. EYRING
Biochim. Biophys. Acta (1970), 219, 276-282

143 - G.G. HAMMES et D.E. TALLMAN
J. Am. Chem. Soc. (1970), 92, 6042-6046

144 - H. TRAUBLE
Naturwissenschaften (1971), 58, 277-284

145 - R. PETERS, J. PETERS, K.H. TEWS et W. BAHR
Biochim. Biophys. Acta (1974), 367, 282-294

146 - M.M. POO et R.A. CONE
Nature (1974), 247, 438-441

147 - A.E. Mc GRATH, C.G. MORGAN et G.K. RADDA
Biochim. Biophys. Acta (1976), 426, 173-185

148 - D. AXELROD, D.E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, E. ELSON et W.W. WEBB
Biophys. J. (1976), 16, 1055-1069

149 - D.E. KOPPEL, D.AXELROD, J. SCHLESSINGER, E. ELSON et W.W. WEBB
Biophys. J. (1976), 16, 1315-1329

150 - J. SCHLESSINGER, D.E. KOPPEL, D. AXELROD, K. JACOBSON, W.W. WEBB et E.L. ELSON
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1976), 73, 2409-2413

151 - J. SCHLESSINGER, D. AXELROD, D.E. KOPPEL, W.W. WEBB et E.L. ELSON
Science (1977), 195, 307-308

152 - T.J. LARDNER
J. Biomechanics (1977), 10, 167-170

153 - E.S. WU, K. JACOBSON et D. PAPAHADJOPOULOS
Biochemistry (1977), 16, 3936-3941

154 - V. FOWLER et D. BRANTON
Nature (1977), 268, 23-26

155 - E. RACKER
"Cell Membranes", G. WEISSMANN et R. CLAIBORNE, p. 135-141, H.P., New York

156 - R. LEMBERG et J. BARRETT
"Cytochromes" (1973), 123-212, Academic Press, Londres

157 - P. NICHOLLS
Biochim. Biophys. Acta (1974), 346, 261-310

158 - J. VANDERKOOI, M. ERECINSKA et B. CHANCE
Arch. Biochem. Biophys. (1973), 157, 531-540

159 - J. VANDERKOOI et M. ERECINSKA
Arch. Biochem. Biophys. (1974), 162, 385-391

160 - M. ERECINSKA et J.M. VANDERKOOI
Arch. Biochem. Biophys. (1975), 166, 495-500

161 - S.P. VAN et O.H. GRIFFITH
J. Memb. Biol. (1975), 20, 155-170

162 - L.R. BROWN et K. WUTHRICH
Biochim. Biophys. Acta (1977), 468, 389-410

163 - P. NICHOLLS et A.N. MALVIYA
Biochem. Soc. Trans.(1973), 1, 372-375

164 - J. VANDERKOOI, M. ERECINSKA et B. CHANCE
Arch. Biochem. Biophys. (1973), 154, 219-229

165 - P.J. QUINN et R.M.C. DAWSON
Biochem. J. (1969), 113, 791

166 - P.J. QUINN et R.M.C. DAWSON
Biochem. J. (1969), 115, 65

167 - L. LETELLIER et SCHECHTER
Eur. J. Biochem. (1973), 40, 507-512

168 - V.V. OBRAZTSOV, V.S. KOBELEF, V.I. TENCHOV, A.A. SELISHCHEVA, L.A. SIBEL'DINA, YU P. KOZLOV et L.P. KAYUSHIN
Biochemistry (URSS) (1976), 41, 1637-1641

169 - K.M. IVANETICH, J.J. HENDERSON et L.S. KAMINSKY
Biochemistry (1973), 12, 1822-1828

170 - A. AZZI, S. FLEISCHER et B. CHANCE
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1969), 36, 322-327

171 - L.S. KAMINSKY, J.J.HENDERSON et K.M. IVANETICH
Biochim. Biophys. Res. Comm. (1973), 51, 40-45

172 - K.M. IVANETICH, J.J. HENDERSON et L.S. KAMINSKY
Biochemistry (1974), 13, 1469-1476

173 - H.K. KIMELBERG, C.P. LEE, A. CLAUDE et E. MRENA
J. Memb. Biol. (1970), 2, 235-251

174 - H.K. KIMELBERG et C.P. LEE
J. Memb. Biol. (1970), 2, 252-262

175 - M. ERECINSKA, J.K. BLASIE et D.F. WILSON
FEBS Lett. (1977), 76, 235-269

176 - N. SHAKLAI, J. YGUERABIDE et H.M. RANNEY
Biochemistry (1977), 16, 5585-5592

177 - W.L.C. VAZ, K. KAUFMANN et A. NICKSCH
Anal. Biochem. (1977), 83, 385-393

178 - D.H. HAYNES
Dechema Monographien "Technische Biochemie", Tutzing Symposion, 1972 der Dechema Band, 71 n 1351 1369, 119-133

179 - M.M. SACRE et J.F. TOCANNE
Chem. Phys. Lipids (1977), 18, 334-354

180 - J. SEELIG, H.U. GALLY et R. WOHLGEMUTH
Biochim. Biophys. Acta (1977), 467, 109-119

181 - I. SAKURAI, S. IWAYANAGI, T. SAKURAI et T. SETO
J. Mol. Biol. (1977), 117, 285-291

182 - J.A. BERDEN, R.W. BARKER et G.K. RADDA
Biochim. Biophys. Acta (1975), 375, 186-208

183 - W.L.C. VAZ, A. NICKSCH et F. JAHNIG
Eur. J. Biochem. (1978), 83, 299-305

184 - K. KANO et J.H. FENDLER
Biochim. Biophys. Acta (1978), 509, 289-299

185 - R. LEMBERG et J. BARRETT
"Cytochromes" (1973), 340-342, Academic Press, Londres

186 - E. MARGOLIASH, S. SPECK, N. OSHEROFF, D. BRAUTIGAN et S. FERGUSON-MILLER
Abstract VIth International Biophysical Meeting, Kyoto (1978), VIII-13 (553)

187 - R.E. DICKERSON
Scientific American (Avril 1972), 58-72

188 - R. LEMBERG et J. BARRETT
"Cytochromes" (1973), 344, Academic Press, Londres

189 - R. RIGLER, C.R. RABL et T.M. JOVIN
Rev. Sci. Inst. (1974), 45, 580-588

190 - G. WEBER
Biochem. J. (1952), 51, 145-155

191 - L. MONNERIE et J. NEEL
J. Chim. Phys. (1965), 504-509

192 - J.F. TOCANNE
Communication personnelle

193 - T.Y. TSONG, T.Z. TSONG, E. KINGSLEY et R. SILICIANO
Biophys. J. (1976), 16, 1091-1104

194 - K. KINOSITA et T.Y. TSONG
Biochim. Biophys. Acta (1977), 471, 227-242

195 - H.T. TIEN et A.L. DIANA
Chem. Phys. Lipids (1968), 2, 55

196 - I. AMDUR et G.H. HAMMES
"Chemical Kinetics", 107-162, Mc Graw Hill Ed., New York.

Imprimerie de L'Université Paul Sabatier
Service Général Offset
118, Route de Narbonne 31077 TOULOUSE Cedex